

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E DO
ULTRA-SOM PULSADO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO E FUNÇÃO MITOCONDRIAL MUSCULAR INDUZIDOS
POR TRAUMA MECÂNICO**

PAULO CESAR LOCK SILVEIRA

Criciúma, junho de 2008.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULO CESAR LOCK SILVEIRA

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E DO
ULTRA-SOM PULSADO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO E FUNÇÃO MITOCONDRIAL MUSCULAR INDUZIDOS
POR TRAUMA MECÂNICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinho
Co-orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

Criciúma, junho de 2008.

RESUMO

Introdução: Muitos estudos têm demonstrado um aumento nas Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e marcadores de danos oxidativos após dano muscular. Recentes achados demonstram que a aplicação do laser de baixa intensidade (LLLT) e de ultra-som pulsado (TPU) modulam muitos processos bioquímicos principalmente diminuição de danos musculares, diminuição de estresse oxidativo, aumento da respiração mitocôndria e síntese de ATP acelerando o processo de cicatrização. **Objetivo:** verificar a influência da LLLT e TPU em parâmetros de danos musculares (CK e fosfatase ácida), estresse oxidativo e atividade antioxidante após lesão muscular traumática. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar machos foram divididos randomicamente em 7 grupos: sham (músculo sem lesão); lesão muscular sem tratamento; lesão muscular e tratamento com gel-salina (0,9%); lesão muscular e tratamento com gel-DMSO (15mg/Kg); lesão muscular e TPU gel-salina, lesão muscular e TPU gel-DMSO; lesão muscular e LLLT. A lesão no gastrocnêmio foi induzida por um único impacto por trauma direto. TPU (duração de 6 min, frequência de 1.0 MHz, intensidades de 0.8 W/cm²) e LLLT (AsGa, 5 J/cm²) foram usadas 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o trauma. Atividade da CK e fosfatase ácida no soro foram usadas como marcadores de lesão muscular esquelética. Anion superóxido, TBARS, carbonilação de proteínas e atividade da superóxido dismutase e catalase foram usadas como indicadores de estresse oxidativo. **Resultados:** todos os parâmetros de dano muscular e estresse oxidativo analisados tiveram um aumento significativo após a lesão muscular e o uso da TPU + gel-DMSO diminuiu significativamente esses resultados. A LLLT diminuiu significativamente níveis de CK, anion superóxido, TBARS e atividade da superóxido dismutase. **Conclusão:** a lesão muscular traumática leva ao aumento na produção de ERO e a TPU + gel-DMSO foi efetiva na redução dos parâmetros de danos musculares e estresse oxidativo, porém, a LLLT diminuiu significativamente parâmetros de danos musculares e agiu de modo parcial nos parâmetros de estresse oxidativo.

Palavras-chave: TPU, LLLT, músculo, lesão muscular e estresse oxidativo

ABSTRACT

Background: Many studies have demonstrated an increase in Reactive Oxygen Species (ROS) and oxidative damage markers after muscle damage. Recent studies demonstrate that therapeutic ultrasound pulsed (TPU) and low-level laser therapy (LLLT) modulate many biochemical processes, mainly decrease of muscular injury, decrease of oxidative stress, increase of mitochondrial respiration and synthesis of ATP, accelerating the healing process. **Objective:** verify the influence of TPU and LLLT in parameters of muscular injury (CK), oxidative stress and antioxidant activity after traumatic muscular injury. **Methods:** Male Wistar rats were divided randomly into seven groups (n=6): sham (uninjured muscle); muscle injury without treatment; muscle injury and treatment with gel-saline (0,9%); muscle injury and treatment with gel-DMSO (15mg/Kg); muscle injury and TPU plus gel-saline; muscle injury and TPU plus gel-DMSO; muscle injury and LLLT. Gastrocnemius injury was induced by a single impact blunt trauma. TPU (6 min duration, frequency of 1.0 MHz, intensity of 0.8 W/cm²) and LLLT (AsGa 5 J/cm²) was used 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hours after muscle trauma. The CK and acid phosphatase activity in serum was used as an indicator of skeletal muscle injury. Superoxide anion, TBARS, protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity was used as indicators of oxidative stress. **Results:** all of muscle damage markers and oxidative stress parameters analyzed have an increased significantly after muscle injury and TPU plus gel-DMSO decreased significantly that results. LLLT decreased significantly level of CK, superoxide anion, TBARS and superoxide dismutase activity. **Conclusion:** muscle injury traumatic induce an increase in production of ROS and TPU plus gel-DMSO be effective in decrease of parameters of muscular damage and oxidative stress, become, LLLT decrease significantly of parameters of muscular damage and act partial mode of parameters of oxidative stress.

Key-words: TPU, LLLT, muscle, muscle injury and oxidative stress

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 Introdução	1
2 Fundamentação Teórica	4
3 Objetivos.....	17

CAPÍTULO II- Artigo

Effects of Therapeutic Pulsed Ultrasound and Dimethylsulfoxide (DMSO) Phonophoresis on Parameters of Oxidative Stress in Traumatized muscle.....	19
--	----

CAPÍTULO III - Artigo

Efeitos do laser de baixa intensidade (asga) na lesão muscular traumática.....	41
--	----

CAPÍTULO IV - Artigo

Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscular healing by low-level laser therapy.....	62
---	----

CAPÍTULO V

Discussão Geral.....	76
Referências.....	80

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A lesão muscular ocorre por uma variedade de mecanismos, como forças diretas, incluindo lacerações e contusões no músculo, e forças indiretas relacionadas à tensão exercida sobre o músculo (Fukushima, 2001). Frequentemente ocorrem em práticas esportivas e atividades diárias. Porém, o processo de reparo é geralmente similar em muitos casos (Li et al, 2005).

Muitos estudos têm demonstrado um aumento nos marcadores de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil em sangue e tecidos de humanos e de animais durante e após a lesão muscular (Pattwell, 2004; Niels, 2005; Zhao, 2004). Embora necessário para a defesa da célula e para as demais funções celulares, as ERO, quando em excesso, podem provocar um desequilíbrio entre a produção e a capacidade de defesa antioxidante, estresse oxidativo, e agredir os constituintes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Após a lesão muscular inicial, o estresse oxidativo pode ser aumentado devido a inúmeros locais de geração de ERO dentro do músculo traumatizado. Podemos incluir como fontes primárias de radicais livres durante e após o trauma a mitocôndria, xantina oxidase (XO) metabolismo de prostanóides e o sistema NADPH oxidase (Reid, 2008).

Em geral, a lesão muscular esquelética tem uma regeneração rápida formando miotubos em três dias. Funcionalmente as fibras musculares são reinervadas em 4 a 5 dias, e um reparo total após 21 a 28 dias (Amaral, 2001). Embora o processo de regeneração músculo esquelético tenha sido amplamente

estudado, questões permanecem obscuras, especialmente os efeitos de vários tratamentos comumente usados para estimular o processo de regeneração muscular, como também o envolvimento das ERO durante esse processo.

Dentro deste contexto, a terapia com ultra-som pulsado (TPU) é comumente usada na reabilitação fisioterapêutica devido a seus efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos. Segundo Markert, 2004, os estímulos não térmicos de ultrasonicação são a principal via de ação da TPU, ao contrário dos efeitos térmicos da terapia com ultra-som contínuo. A ação terapêutica da ultra-sonicação pode produzir efeitos de cicatrização em biomarcadores de regeneração muscular, principalmente lesões por contusões e produzir mudanças na permeabilidade de membrana e estimular o transporte de substâncias de mensageiros secundários, como cálcio através da membrana celular (Wilkin, 2003).

Devido a essas características da TPU, sua utilização pode ser associada com fármacos antioxidantes e antiinflamatórios (Fonoforese), com o objetivo de potencializar os efeitos cicatrizantes dessas duas terapias (Hill et al., 2005).

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente dipolar amplamente usado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas (Camici, 2008). Atualmente, DMSO é comumente usado em estudos no músculo esquelético como um seletivo antioxidante ou como solvente para numerosas drogas (Velasco, 2003). Sendo altamente permeável, o DMSO tem ação não enzimática e seu poder antioxidante se dá primariamente como scavenger de radical hidroxil e de outras ERO (Muhanraj, 1998).

Méis, 1998 e Velasco, 2003 postulam que a lesão muscular isquêmica induz o paradoxo do cálcio e do oxigênio que ocorrem por altas concentrações de

cálcio intracelular, e o DMSO por possuir efeito direto nesse íon pode proteger a célula de danos estruturais.

A laserterapia de baixa potência (LLLT) é também usada por fisioterapeutas para acelerar a cicatrização muscular. Recentes estudos demonstram que a LLLT melhora significativamente o processo de regeneração muscular, induzindo a formação de novas miofibrilas. Essa terapia modula muitos processos bioquímicos como aumento no sistema antioxidante, diminuição de danos musculares, reparo tecidual, ativação de metaloproteases, aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP, acelerando o processo de cicatrização (Silveira, 2007).

Evidências da literatura sugerem que a bioestimulação com LLLT produz efeitos primários durante a fase de proliferação celular no processo de cicatrização muscular (Sommer, 2001). Em nível celular, a LLLT causa efeitos biológicos significativos como proliferação celular, síntese de colágeno, liberação de fatores de crescimento celular e estimulação de células polimorfonucleares (O'Brien, 1998; Sommer, 2001).

Considerando que o estresse oxidativo está envolvido no processo de cicatrização muscular, o uso da TPU em conjunto com DMSO e a LLLT podem agir de forma muito efetiva nesse processo devido a essas terapias agirem em vias importantes na produção de ERO.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 – Lesão muscular

Os músculos representam um grande contingente de massa no corpo humano, constituindo 40% a 45% do total da superfície. A composição estrutural consiste em milhares de fibras musculares, nervos, vasos sanguíneos e, extracelularmente, são unidos por tecido conjuntivo. Cada fibra muscular é constituída por miofibrilas, que são os elementos contráteis, cercada por uma parte solúvel denominada retículo sarcoplasmático, contendo uma matriz celular e organelas (Huard et al, 2002).

A laceração muscular é uma lesão incomum no esporte, enquanto que 90% de todas as lesões esportivas relatadas estão entre contusão e tensão. A contusão muscular ocorre quando o músculo é submetido à repentina força compressiva, tal como um golpe direto. O trauma muscular por contusão atinge tipicamente o local de contato no esporte. Ao considerarmos corrida e salto, temos atividades mais comuns de lesão por tensão (Tidball, 2005; Toumi e Best, 2006).

Conforme Jarvinen, 2005, a cicatrização do músculo esquelético danificado segue um padrão constante independente da causa (contusão, tensão ou laceração). Três fases têm sido identificadas neste processo:

1. fase de lesão, caracterizada por uma ruptura 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 no tecido necrosado, regeneração das miofibrilas e produção concomitante de tecido

conectivo cicatrizado, como também crescimento capilar dentro da área lesionada;

3. fase de remodelação, período durante o qual a maturação das miofibras regeneradas, contração e reorganização do tecido cicatrizado, e recuperação da capacidade funcional do músculo ocorre.

As últimas duas fases – reparo e remodelação – são usualmente associadas ou sobrepostas.

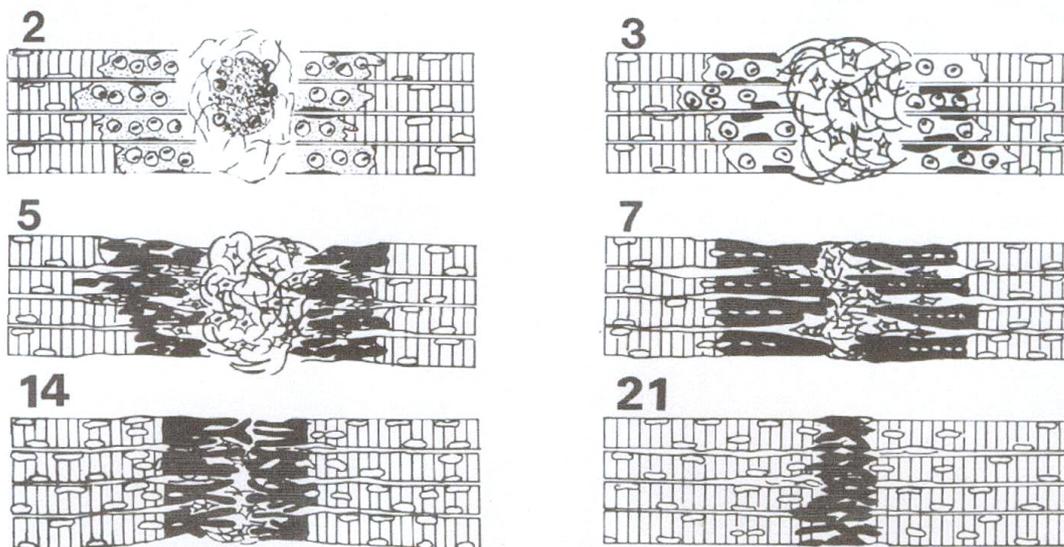


Figura 1. Ilustração esquemática da cicatrização no músculo esquelético (Jarvinen, 2005). No dia 2 as partes necrosadas na transecção das miofibrilas são removidas por macrófagos enquanto, concomitante, formação de tecido conectivo cicatrizado por fibroblastos inicia na zona central (ZC). No dia 3 as células satélite se tornam ativadas dentro dos cilindros da lâmina basal na zona de regeneração (ZR). No dia 5 os mioblastos são fundidos em miotubos na ZR, e o tecido conectivo na ZC se torna denso. Dia 7, a regeneração das células musculares é estendida para fora do cilindro da lâmina basal para dentro da ZC e inicia a penetração através da cicatrização. No dia 14 a cicatrização da ZC foi condensada adicionalmente e reduzido o tamanho, e a regeneração das miofibras fechou a abertura da ZC. Por fim, no dia 21 os entrelaçados de miofibrilas serão virtualmente fundidos com pouca intervenção de tecido conectivo (cicatrizado).

A inflamação é um evento celular inicial e é caracterizada pela migração de células polimorfonucleares e formação de coágulo e atividade de substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas, serotoninas e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Neste período a liberação de histamina aumenta a permeabilidade dos capilares, ocasionando edema na região lesada. Os neutrófilos

têm a função de eliminar as partículas estranhas do local lesado, os mastócitos fagocitam as bactérias e debris do tecido lesionado (Kitchen e Bazin, 2001; Starkey, 2002; Low e Reed, 2003).

2.2 - Radicais Livres, Espécies Reativas de Oxigênio

Radicaís Livres (RL) são moléculas ou fragmentos moleculares reativos que contêm um elétron não pareado em sua órbita mais externa. Sua produção está relacionada com o equilíbrio de valência na camada mais externa da molécula. Quando formados, os RL tendem a extrair elétrons de outras moléculas para alcançar um estado quimicamente mais estável e criam novas moléculas de RL (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Os RL são importantes para o organismo, pois eles agem como mediadores de várias funções celulares. Por exemplo, quando as células são agredidas por algum agente estressor (que também pode ser RL) elas acabam produzindo RL para combater estes agentes (Polidori et al., 2000). Embora esses processos sejam normais para a vida das células, a produção excessiva de ERO pode induzir danos a componentes celulares, entre eles ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos que quando em grande extensão podem levar à morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Geralmente de 2% a 5% do oxigênio utilizado na fosforilação oxidativa (STE) são desviados para a formação de RL. Porém, nem todos radicais livres formados nos sistemas biológicos são derivados do oxigênio. Outras moléculas como monóxido de nitrogênio, por exemplo, também levam à formação de RL. É importante ainda destacar que durante a formação de RL e na cascata de

degradação outras espécies reativas vão se formando, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlet (1O_2). Todos esses constituintes biológicos são denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Matsuo; Kaneko, 2000).

Na cadeia respiratória mitocondrial, os complexos I e III e oxidação da Ubiquinona são os principais locais conhecidos para a produção de superóxido e H_2O_2 . Isso é causado pela transição de um elétron da NADH e FADH para ubiquinona formando semiquinona, e o outro elétron forma o superóxido. O superóxido é rapidamente reduzido pelo superóxido dismutase mitocondrial (SOD) à H_2O_2 . Quando um metal é catalizado pela reação de Fenton ou Haber-Weiss entre a dismutação de superóxido para H_2O_2 é formado o radical hidroxil (Ji, 1999).

Adicionalmente, outros dois importantes eventos se destacam na produção de ERO, o processo inflamatório e a isquemia-reperfusão. O processo inflamatório resulta numa resposta aos agentes infecciosos ou a outros estímulos, em que células fagocíticas, principalmente neutrófilos e macrófagos, realizam um rápido consumo de oxigênio, processo conhecido como *respiratory burst*. Esse processo é uma das fontes de formação de superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, ácido hipocloroso e peroxinitrito (Iles, 2002). Além de apresentarem ação antitumoral, alguns destes intermediários reativos derivados do oxigênio participam diretamente da defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus, protozoários e fungos (Barreiros, 2006).

O *respiratory burst* resulta da atividade da NADPH oxidase, uma enzima que catalisa a transferência de elétrons da NADPH para O_2 formando superóxido. Na presença da superóxido dismutase o superóxido é dismutado formando um importante agente microbicida, o peróxido de hidrogênio (Iles, 2002). O peróxido de

hidrogênio pode ser catalisado pela mieloperoxidase, presente principalmente em neutrófilos, dando origem a uma toxina ainda mais potente na sua ação microbicida denominada de ácido hipocloroso (HOCl) (Konig, 2002).

Uma vez formado, o HOCl tende a oxidar aminoácidos para síntese de cloraminas. Estes últimos derivados perdem Cl^- e CO_2 , formando aminas que são hidrolisadas para aldeídos. No caso da treonina, o hidroxialdeído resultante sofre desidratação e origina a acroleína (cancerígeno, destrói fibras elásticas, irrita mucosas) (Konig, 2002). O HOCl ainda reage com peróxido de hidrogênio formando oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$). Há ainda a possibilidade de formar radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pela reação de Haber-Weiss (Dalle-donne, 2003).

Em processo de isquemia-reperusão, a Xantina Oxidase (XO) catalisa a degradação do monofosfato de adenosina (AMP), levando ao aumento na produção de superóxido. Caso o fornecimento de energia não seja suficiente para produção de ATP (trifosfato de adenosina), o AMP, formado do ATP pela reação da adenilato quinase, é degradada a hipoxantina. Em condições normais, a degradação de hipoxantina ocorre via xantina desidrogenase (Xdh) utilizando adenina dinucleotídeo como aceptor de elétrons (Barreiros, 2006).

Porém, durante o trabalho muscular isquêmico, a diminuição do fluxo de oxigênio reduz a produção de ATP dependentes de Ca^+ . Esse mecanismo aumenta a concentração de íons de Ca^+ na célula e ativa proteases intramusculares dependentes de Ca^+ , as quais estimulam a redução da Xdh e formando a XO^9 . A XO converte a hipoxantina para xantina e ácido úrico usando o oxigênio molecular como receptor de elétrons, formando assim o ânion superóxido (Ji, 1999).

Em condições aeróbicas, o oxigênio suficiente assegura que o ATP seja repostado via fosforilação oxidativa mitocondrial e que a hipoxantina/xantina sejam,

primeiramente, convertidas para ácido úrico através da xantina desidrogenase. Além disso, o músculo esquelético tem baixa atividade da XO. Todavia, a XO pode ser um importante caminho quando o músculo apresentar um déficit de adenina dinucleotídeo. Essa situação, teoricamente, pode acontecer em situação isquêmica, exercício isométrico, sucessivos traumas ou tensão sobre o músculo, alta velocidade, déficit de oxigênio e exercícios com limitação vascular de fluxo sanguíneo (Iles, 2002).

2.3 Danos oxidativos

Um alvo clássico dos ataques dos RL são os ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas celulares e em lipoproteínas. O processo de oxidação resultante do ataque de radicais livres sobre a membrana chama-se lipoperoxidação. Durante a lipoperoxidação, intermediários podem sofrer quebras gerando hidrocarbonetos de cadeia curta (etano, pentano), aldeídos (como o malonaldeído, 4-hidroxinonenal), epóxidos e outros produtos altamente citotóxicos. Como resultado da lipoperoxidação as membranas sofrem alterações na fluidez e na permeabilidade, resultando em perda na homeostase e morte celular (MATSUO e KANEKO, 2001).

Segundo Halliwell e Gutteridge, 2007 a lipoperoxidação consiste em três fases: iniciação, propagação e término. Na fase de iniciação (1), RL renova hidrogênio do ácido graxo insaturado produzindo um radical de lipídeo (\dot{L}), que ao reagir com o oxigênio molecular forma o radical peroxila ($LOO\dot{}$). Na propagação (2) o $LOO\dot{}$ retira hidrogênio de outro lipídeo, formando o hidroperóxido de lipídeo ($LOOH$) e \dot{L} e assim sucessivamente. Na fase terminal (3), os radicais produzidos se combinam formando um não-radical. O $LOOH$ pode sofrer outras reações produzindo aldeídos e alcanos.

As proteínas também são alvo de ataque dos radicais livres. A oxidação dos aminoácidos resulta na formação de grupos carbonil, tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função normal da proteína (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Especificamente, os grupos carbonil são formados principalmente a partir da oxidação de alguns aminoácidos mediados por ROS, como lisina, argenina, prolina e treonina. Porém, reações secundárias de cadeias laterais de alguns aminoácidos (cisteína, lisina e histidina) com subprodutos da lipoperoxidação e da oxidação de carboidratos também foram grupos carbonil (Dalle-donne, 2003).

Está bem estabelecido que a oxidação de proteínas depende dos níveis de proteossomas intracelulares. De acordo com Davies e Shringarpure, 2004 os danos em proteínas mediados por radicais livres e o acúmulo de proteínas oxidadas levam a um concomitante aumento na oxidação de proteínas reduzindo a degradação de proteínas oxidadas. Proteases intracelulares são responsáveis por 70% a 80% da degradação de proteínas após a oxidação e esse mecanismo é essencial para os sistemas de reparo e antioxidantes. Assim, o proteossoma constitui uma parte importante do sistema de defesa antioxidante.

Outro alvo muito importante dos radicais livres é o DNA. A formação de radicais livres próximo ao DNA pode resultar na oxidação de bases de pirimidina e purina, e quebras na fita. Dentre as bases, a guanina é altamente sensível à oxidação (formação de 8-hidroxideoxiguanosina, 8-OhdG) mediado por radicais livres. Essas alterações no DNA têm sido associadas com processos mutagênicos e carcinogênicos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

2.4 Defesas Antioxidantes

Segundo Halliwell e Gutteridge, 2007 as defesas antioxidantes podem atuar de forma associada ou independente por duas vias: 1) enzimáticas: este sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX). Essas enzimas são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém suas atividades podem aumentar em função da presença de ERO.

Superóxido Dismutase (SOD): é a enzima responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença de próton H^+ . Sua composição apresenta diferentes grupos protéicos. Nos sistemas eucariontes, atualmente se conhecem duas formas: a) SOD-CuZn, que está presente principalmente no citosol; b) SOD-mn está localizada primariamente na mitocôndria (Matsubara e Ferreira, 1997).

Catalase (CAT): é uma hemoproteína citoplasmática e sua função é converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Está localizada, principalmente, no perioxossoma, entretanto outras organelas como as mitocôndrias podem conter alguma atividade da CAT. Nos seres humanos é encontrada na maioria dos órgãos, tais como: fígado, cérebro, coração e músculo esquelético, medula óssea e mucosas e sua atividade é dependente de NAPH (Scott et al., 1991).

Glutathione Peroxidase (GPX): é uma enzima selênio-dependente e age sobre H_2O_2 , convertendo-o em água, podendo agir também sobre os lipídeos peroxidados tornando-os hidroxilados e reverter a oxidação de proteínas. Após reagir com ERO, a GPX é convertida a glutathione oxidada (GSSH), podendo ser reconvertida a glutathione reduzida GSH, pela ação da enzima glutathione redutase (Flohe, 1982).

2) Não enzimáticas: que incluem as vitaminas E, C e betacaroteno, glutathione (GSH), N-acetilcisteína (NAC), entre outros. Grandes partes desses antioxidantes são encontradas na alimentação e podem ser suplementados por uma dieta alimentar. O sistema não-enzimático inclui as vitaminas E, C e betacaroteno, glutathione (GSH), N-acetilcisteína (NAC), entre outros. A maioria desses antioxidantes é encontrada na alimentação e pode ser suplementada por uma dieta alimentar. A Vitamina E e betacaroteno são antioxidantes lipossolúveis e protegem as membranas celulares dos ataques por RL. A vitamina C e a glutathione são hidrossolúveis e fundamentais na regeneração da Vitamina E e proteção dos constituintes lipídicos e protéicos celulares (Urso e Clakson, 2003).

2.5 Estresse oxidativo e lesão muscular

A lipoperoxidação parece ser um importante mecanismo subjacente ao dano muscular. Embora tenha sido demonstrado que enzimas antioxidantes aumentam após o estresse oxidativo, este aumento na defesa antioxidante pode não ser fisiologicamente efetivo quando ocorre um aumento de eventos pró-oxidantes (Li, 2005).

A capacidade das células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos de produzir oxidantes e citocinas após o dano muscular é um interessante paradoxo. Por um lado, a geração de oxidantes durante a fagocitose representa um papel integral no início do dano muscular. Citocinas pró-inflamatórias como interleucina – 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) regulam a adesão de moléculas intercelulares requeridas no fluxo de neutrófilos e macrófagos. Macrófagos liberam citocinas envolvidas na quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células satélites necessárias para o reparo tecidual. Paradoxalmente, oxidantes não são confinados

na fagossoma, e o vazamento para o tecido saudável ocasiona um dano tecidual indesejável (Cannon, 1998).

Além disso, citocinas como IL-1 β e TNF- α podem aumentar a produção de oxidantes por uma estimulação direta de neutrófilos que produzem radical superóxido, aumentando a atividade da XO. Portanto, é necessário um balanço coordenado na produção de oxidantes após lesão muscular, para sinalizar células imunes sem ocorrência de dano oxidativo. (Page, 1998; Powell 1998).

A resposta inflamatória intensa é acompanhada tanto por fagocitose quanto por infiltração de monócitos no dano tecidual. Outra hipótese é que a produção de ERO está aumentada dentro das primeiras 24 horas após o dano muscular (BEST, 1999).

2.6 Terapia com ultra-som pulsado (TPU)

Ultra-som pulsado é uma modalidade eletroterapêutica que tem sido utilizada tipicamente para diminuir os sintomas da inflamação (dor e edema) e aumentar a velocidade de cicatrização em muitas condições, lesão de tecidos moles, lesões epidérmicas e musculares, artrite reumatóide e edema crônico. Absorção de ondas ultra-sônicas pelos tecidos causa oscilações em seu interior, levando a alterações biológicas (Craig, 1999).

O Ultra-som teve sua descoberta em 1880, quando o casal Pierre e Marie Curie descobriu o efeito piezoelétrico através da aplicação de uma corrente elétrica senoidal sobre um cristal de quartzo colocado entre duas placas metálicas. Estes cientistas constataram a geração de uma vibração de alta frequência. Langevin, Tournier e Howeck construíram pela primeira vez, em 1917, em Paris, um aparelho

piezoelétrico que, embora tivesse utilidade para a Marinha, apresentava aplicações no campo da biologia, observando-se que sob a ação dos ultra-sons que emitia, morriam pequenos peixes depois de grandes convulsões (Haar, 2007).

Na Fisioterapia a terapia ultra-sônica é definida pelas oscilações de ondas cinéticas ou mecânicas produzidas pelo transdutor vibratório, que aplicado sobre a pele atravessa e penetra no organismo em diferentes profundidades, dependendo da frequência, que varia de 0,75 a 3,0 MHz (Robertson e Ward, 1997), sendo utilizado no tratamento de pequenas lesões musculares, acelerando o processo de cicatrização muscular e epitelial (HAAR, 2007).

2.7 Laserterapia de baixa potência

A produção do laser resulta de um elétron ou uma molécula, que sofre um salto quântico quando estimulado, passando de um baixo a um alto estado de energia, passando a emitir ondas na mesma frequência, comprimento de onda e direção, originando o feixe laser que possui mais potência que outras radiações ópticas não modificadas ou estimuladas (Ortiz, 2001).

A laserterapia de baixa potência é uma denominação genérica que define a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminescentes 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).

A interação da radiação laser com os tecidos corporais ocorre mediante os fenômenos de reflexão e refração 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. A atenuação da radiação visível ou infravermelha em qualquer meio homogêneo está expressa pela lei de Lambert-Bier (Agne, 2004).

Alguns autores sugerem que os componentes celulares podem absorver fótons fornecidos através da energia do laser de baixa potência (foto-receptores) e acelerar a produção de ATP fornecendo energia para a célula, que por sua vez pode modular a resposta inflamatória (Albertini, 2002; Say, 2003).

Os componentes da cadeia respiratória são postulados como foto-receptores primários, principalmente o citocromo c oxidase. Quando as células são irradiadas com várias faixas de luz, esta é absorvida pela cadeia respiratória. Os primeiros eventos fotoquímicos e fotofísicos acontecem na mitocôndria de células eucariontes e na membrana citoplasmática (Karu, 1999).

A mitocôndria possui um mecanismo para a reabsorção de oxigênio e este pode ser uma fonte de elétrons para a fosforilação oxidativa de ATP sob condições fisiológicas. Os efeitos da laserterapia sobre atividades da maioria das células envolvidas no processo cicatricial sugere que a fotoestimulação com baixa potência intermedia os processos de inflamação por modular os níveis de várias prostaglandinas (Ortiz, 2001).

O laser de baixa potência tem um efeito cicatricial muito eficaz. Seu êxito se deve às particularidades de respostas que induzem os tecidos, como redução de edema, diminuição do processo inflamatório, fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização. O laser melhora a migração de neutrófilos, linfócitos e sobre a neoformação de vasos sanguíneos (Lange, 2003).

2.8 Efeitos biológicos do dimetilsufóxido (DMSO)

O DMSO é uma substância orgânica de fórmula química C_2H_6SO (Rosenbaum; Herschler; Jacob, 1965), peso molecular 78 (Carpenter; Angel; Morgan, 1994) e temperatura de congelamento $18,5^{\circ}C$ (Brayton, 1986). Quando administrado topicamente reage com a água do ar e dos tecidos por meio de reação exotérmica (Brayton, 1986), que pode estar relacionada às suas ações como fármaco e à sua capacidade de solvente (Rosenbaum; Herschler; Jacob, 1965).

O dimetilsufóxido (DMSO) é um composto conhecido desde a segunda metade do século XIX como um solvente orgânico potente. Por ser um subproduto da indústria de extração de celulose e, portanto, facilmente disponível, passou a ser largamente utilizado a partir da década de quarenta do século XX, para fins industriais. Duas décadas mais tarde, o DMSO foi introduzido na medicina (Alsup, 1984).

Muitas propriedades farmacológicas e terapêuticas, já verificadas, resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e vários fármacos sem alterar, de forma irreversível, a configuração molecular (Rubin, 1983).

Atualmente, DMSO é comumente usado em estudos com tecido muscular como um seletivo antioxidante (OH^-) ou um solvente de numerosas drogas. É altamente permeável, não enzimático, antioxidante contendo enxofre agindo primariamente no radical hidroxil, podendo também, ser *scaveger* de outras ROS (Koksal, 2003; Vignaud, 2005; Wakata, 2001).

3 Objetivos

Diante das evidências de que a lesão muscular traumática aumenta a produção de ERO, pressupõe-se que o uso das terapias com TPU e LLLT possa amenizar esses efeitos. A partir de tais pressupostos foram elaborados os seguintes objetivos:

3.1 Geral

Verificar os efeitos da terapia com ultra-som pulsado (TPU) e do laser de baixa potência sobre marcadores de estresse oxidativo e função mitocôndrial muscular induzidos por trauma mecânico.

3.2 Específicos

- Verificar se o uso das terapias com TPU e LLLT diminuem a lesão muscular após trauma mecânico.
- Verificar se a produção de anion superóxido, danos oxidativos e atividades antioxidantes musculares são diminuídas com o uso das terapias com TPU e LLLT após trauma mecânico.
- Verificar o efeito da LLLT nas atividades dos complexos I, II, III e IV e atividade da SDH após lesão muscular traumática.

CAPÍTULO II

Effects of Therapeutic Pulsed Ultrasound and Dimethylsulfoxide (DMSO) Phonophoresis on Parameters of Oxidative Stress in Traumatized Muscle.

Submetido a Cell Biology International

**Effects of Therapeutic Pulsed Ultrasound and Dimethylsulfoxide (DMSO)
Phonophoresis on Parameters of Oxidative Stress in Traumatized Muscle.**

Paulo C. L. Silveira, MSc^a; Eduardo G. Victor^c, Luciano A. Silva^a, Débora Schefer^a,
Emilio L. Streck, PhD^b; Marcos M. Paula^c, PhD, Ricardo A. Pinho, PhD^a

^aLaboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/PPGCS/UNESC

^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental/PPGCS/UNESC

^cLaboratório de Síntese de Compostos Multifuncionais/PPGCS/UNESC

Address:

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

Av. Universitária, 1105 – Bairro Universitário

88806-000 - Criciúma – SC/Brasil

e-mail: silveira_paulo2004@yahoo.com.br

ABSTRACT

BACKGROUND: Many studies have demonstrated an increase in Reactive Oxygen Species (ROS) and oxidative damage markers after muscle damage. Phonophoresis aims to achieve therapeutically relevant concentrations of the transdermally introduced drug in the tissues subjected to the procedure by the use of ultrasound waves. **OBJECTIVE:** the aim of the study was to evaluate the effects on the TPU together with gel-DMSO in the parameters of muscular damage and oxidative stress. **METHODS:** Male Wistar rats were divided randomly into six groups (n=6): sham (uninjured muscle); muscle injury without treatment; muscle injury and treatment with gel-saline (0,9%); muscle injury and treatment with gel-DMSO (15mg/Kg); muscle injury and TPU plus gel-saline; muscle injury and TPU plus gel-DMSO. Gastrocnemius injury was induced by a single impact blunt trauma. TPU (6 min duration, frequency of 1.0 MHz, intensity of 0.8 W/cm²) was used 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hours after muscle trauma. The CK and acid phosphatase activity in serum was used as an indicator of skeletal muscle injury. Superoxide anion, TBARS, protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity was used as indicators of oxidative stress. **RESULTS:** showed that TPU and gel-DMSO improved muscle healing. Moreover, superoxide anion production, TBARS level and protein carbonyls levels, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity were all decreased only in the group TPU plus gel-DMSO. **CONCLUSION:** our results show that DMSO is effective in the reduction of the muscular lesion and in the oxidative stress muscular after mechanical trauma only when used with TPU.

INTRODUCTION

Skeletal muscle injuries often occur in professional and recreational sports or daily activities. These injuries can occur via a variety of mechanisms, including those arising from direct (laceration and contusion) or indirect trauma (ischemia, denervation, and strain), but the general process of muscle repair is similar in most cases.¹

Many studies have demonstrated an increase in reactive oxygen species (ROS) and oxidative damage markers in blood and tissues of humans and animals during and after muscle damage.²⁻⁴ After initial muscle injury, oxidative stress could be increased due to a number of potential sites for the generation of ROS within the traumatized muscle.⁵ Primary sources of free radicals may include mitochondria, xanthine oxidase enzymes (XO), prostanoid metabolism, and NAD(P)H oxidases.⁶

In general, injured skeletal muscle of mammals rapidly regenerates forming myotubes in 3 days, functionally reinnervated muscle fibers in 4–5 days, and fully repaired fibers after 21–28 days. Although the skeletal muscle regeneration process has been amply studied, questions remain, especially regarding the effect of various treatments commonly used to stimulate the muscle regeneration process.^{7,8}

In this context, therapeutic pulsed ultrasound (TPU) is commonly used in the rehabilitative setting to elicit thermal or non-thermal physiological effects. Johns et al⁹ hypothesize that it is not necessarily the heating effects of TPU, but rather the non-thermal stimulus, that may produce beneficial healing effects on biomarkers of skeletal muscle regeneration, mainly in contusion injury.¹⁰

During the inflammatory phase, TPU has a stimulating effect on mast cells, platelets, white cells with phagocytic roles, and macrophages. By increasing the

activity of these cells, the overall influence of therapeutic TPU is certainly pro-inflammatory rather than anti-inflammatory. The benefit of this mode of action is not to increase the inflammatory response or the intensity of this stage, but rather to act as an inflammatory optimizer.^{11,12}

The role of non-thermal mechanisms of ultrasound in tissue regeneration and soft tissue repair has also been widely established. At a cellular level, it has been hypothesized that changes in diffusion rates and membrane permeability to ions due to acoustic streaming and stable cavitation can stimulate cells by upregulation of signaling molecules. Due to these properties, TPU can be used together with anti-inflammatory or antioxidant drugs promoting a higher absorption and potentiating their effects.^{13,14}

Phonophoresis aims at achieving therapeutically relevant concentrations of the drug introduced transdermally into the tissues subjected to the procedure with the use of ultrasound waves. Appropriate use of this physical method enables rapid and active diffusion of the drug into the tissues in a manner that does not inactivate the drug molecules or produce adverse effects.¹⁵

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a dipolar solvent widely used to solubilize small organic molecules. Currently, DMSO is commonly used in studies of skeletal muscle as a selective antioxidant or as a solvent for numerous drugs.¹⁶ It is a highly permeable, nonenzymatic, sulfur-containing antioxidant and is primarily an OH⁻ scavenger, although it can also scavenge other ROS.¹⁷

Considering that the oxidative stress happens in the process of muscular healing after lesion, the objective of the study was to evaluate the effects of TPU together with DMSO on the parameters of muscular damage and oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (250-300 g) obtained from the Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brazil. were caged in groups of five and provided with commercial rat chow and water ad libitum and maintained on a 12 h light/12 h dark cycle. The animals were divided randomly into six groups (n=6): sham (uninjured muscle); muscle injury without treatment; muscle injury and treatment with gel-saline (0,9%); muscle injury and treatment with gel-DMSO (15mg/Kg); muscle injury and Treatment Pulsed Ultrasound (0.8 W/cm²) plus gel-saline (0.9%); muscle injury and Treatment Pulsed Ultrasound (0.8 W/cm²) plus gel-DMSO (15mg/Kg). All studies were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of the Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brazil.

Muscle injury model

The muscle trauma model was described by Rizzi et al¹⁸. The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg). Gastrocnemius injury was induced by a single impact blunt trauma in a press developed by the Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brazil). Briefly, injury was produced by a metal mass (0.459 Kg) falling through a metal guide from a height of 18 cm. The impact kinetic energy delivered was 0.811 Joules. Control rats were also anesthetized to ensure standardization, but without muscle trauma.

Treatment

Treatment Pulsed Ultrasound, TPU, (6 min duration, frequency of 1.0 MHz, intensity of 0.8 W/cm² and effective radiating area, ERA, 1 cm²) was used 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hours after muscle trauma. The Groups with muscle injury and treatment with gel-saline and muscle injury and treatment with gel-DMSO also were exposure to treatment during six minutes.

Sacrifice Protocol

Two hours after to the last application, the animals were killed by decapitation and the blood was collected. The lesioned region of the muscle gastrocnemius was surgically removed and immediately processed, aliquoted and stored at -70°C for later analysis.

Sample preparation

Gastrocnemius was homogenized in the buffer used for each technique. The homogenates were centrifuged at 1000 X g for 10 min at 4°C and the supernatants kept at -70°C until used for the experiments. The maximal period between homogenate preparation and biochemical analysis was always less than 5 days.

Biochemical Assays

Creatine Kinase (CK) levels: The CK activity in serum was used as an indicator of skeletal muscle injury. The reaction mixture for the creatine kinase assay contained 100 mM TriseHCl buffer, pH 7.5, 30 mM phosphocreatine, 20 mM glucose, 12 mM magnesium acetate, 10 mM diadenosine pentaphosphate, 15 mM sodium azide, 20 mM n-acetylcysteine, 2 mM ADP, 5 mM AMP, 2 mM NADP, 3500 U/l hexokinase,

2000 U/l glucose-6-phosphate dehydrogenase and approximately 1.5 mg protein, in a final volume of 1200 ml. Creatine kinase activity was calculated based on NADH appearance (formation) monitored with a spectrophotometer at 340 nm at 37 C.^{19,20} Creatine kinase activity was expressed as standard units per liter.

Acid Phosphatase activity: Acid phosphate was determined in serum with a specific kit obtained by Labtest Diagnóstica SA, Brazil. The reading was made starting from an enzymatic system with a kinetic method, according to the technical orientations observed in the bulletin of the referred kit.

Superoxide Anion: Were determined in tissue through rate of oxidation of the adrenaline read from the absorbance at 780 nm as described by McCord.²¹ Results were expressed in nmol/min/mg protein.

Lipid Peroxidation: As an index of lipid peroxidation was used the formation of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS) during a TBA-heating reaction as previously described by Draper and Hadley.²² Briefly, the samples were mixed with 1 ml of 10% trichloroacetic acid and 1 ml of 0.67% thiobarbituric acid. Subsequently, they were heated in a boiling water bath for 30 min. TBARS level were determined by the absorbance at 532nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. Results were expressed as TBARS level (nmol/mg protein).

Protein Carbonyls: The oxidative damage to protein was measured by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH).²³ Proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and

reacted with DNPH. The samples were then redissolved in 6M guanidine hydrochloride and carbonyl contents were determined through the absorbance at 370 nm using a molar absorption coefficient of 22.0000M^{-1} . Results were expressed as Carbonyl Content (nmol/mg protein).

Superoxide Dismutase (SOD) activity: SOD activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline autooxidation as absorbance at 480 nm, as previously described Bannister and Calabrese²⁴ and results were expressed in U SOD/mg protein.

Catalase (CAT) activity: Catalase activity was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm²⁵ and results were expressed in U CAT/mg protein.

Protein Determination: The amount of protein in the samples tested for TBARS, protein carbonyl, and enzymes activities were determined using the Lowry technique.²⁶

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the LSD test when p values were significant ($p < 0.05$). All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software.

RESULTS

Muscle injury parameters

Acid phosphatase and CK activities are shown in table 1. The results indicate that the protocol of traumatic muscular lesion used had success in those parameters. In CK activity the groups that received gel-DMSO with or without TPU show a significant decrease. However, the acid phosphatase activity only the group TPU plus gel-DMSO had a significantly decrease.

Superoxide anion production

In figure 1 was observed that only the group TPU plus gel-DMSO showed a significant decrease in $O_2^{\bullet -}$ production when compared to animals without treatment.

Superoxide Dismutase and Catalase activities

In the illustration 2A and 2B show a significant increase in the antioxidant enzymes activity (SOD and CAT) after 5 days of muscular lesion without treatment. Although only SOD activity had a significant decrease in the group TPU plus gel-DMSO.

Lipid peroxidation and protein carbonyls

According to illustrations 3A and 3B the levels of lipid peroxidation and proteins carbonylation present a significant increase after 5 days of muscular lesion without treatment. In relation to lipid peroxidation, the groups that received TPU, with or without gel-DMSO they had a significant decrease. In relation to proteins carbonylation the groups that received gel-DMSO, with or without TPU also had a

significant decrease, so we can observe that the group that received TPU plus gel-DMSO had difference in those two parameters.

DISCUSSION

The study analyzed the effects of TPU together with DMSO on the parameters of muscular damage and oxidative stress.

The activity of creatine kinase (CK) and acid phosphatase in serum after five days of treatment were assessed as markers of muscular damage. Table 1 shows that the group that received TPU plus DMSO gel had a significant decrease in those two markers, being the group that showed the best results.

Pulsed ultrasound is an electrotherapeutic modality that has been typically used to decrease the symptoms of inflammation and to increase the rate of healing in many conditions, mainly in muscle damage.²⁷ The isolated use of ultrasound accelerates the recovery of muscle injuries, but these effects can be potentialized with the use of pharmacological agents. Thus, the combined use of ultrasound and inflammatory agents can represent an important alternative in the treatment of muscle injuries. Additionally, the mechanism through which ultrasound helps tissue repair is probably related to its mechanical effects (ultrasonication), or “micromassage” of the tissue, producing a change in membrane permeability and stimulating the transport of secondary messenger substances, such as calcium, across the cell membrane. These secondary messengers may then stimulate the proliferation of myogenic cells—in the case of skeletal muscle—the satellite cells.^{10,28}

DMSO is commonly used in studies of skeletal muscle as a selective antioxidant or as a solvent for numerous drugs. DMSO has a remarkable and very

specific effect on myosin by inhibiting ATPase activity, as well as positively influencing actin, Ca^{2+} and regulatory proteins.^{29,30} According to Camici et al³¹, DMSO is also used as a solvent for chemotherapeutic drugs and, due to its anti-inflammatory properties, it has been successfully used in humans for treating rheumatic, pulmonary, gastrointestinal, muscle, neurological, urinary, and dermatological disorders. Thus, the effect of DMSO can be enhanced when used with TPU.

Studies conducted over the past 15 years indicate that reactive oxygen species (superoxide, hydroxyl radicals, nitric oxide, peroxynitrite, and the free radical-derived product hydrogen peroxide) play an important role in the inflammation and or infection-induced alterations in muscle function.³² ROS presence is essential to protect the cell against the invasion of infectious agents. However, when the production is excessive, they can damage biomolecules and hinder the process of recovery of the lesioned tissue.³³

Results (figure 1) show that muscle injury causes an increase in superoxide anion and only a treatment with ultrasound plus DMSO gel decreased this response. These therapeutic responses may be related with two events. First, a possible decrease of the inflammatory response stimulated by TPU plus DMSO. Acute inflammation in tissue is an early post-injury response. It is characterized by a rapid increase in local blood flow, vascular permeability and an influx of neutrophils.³⁴ In the inflammatory process, neutrophils produce superoxide in the NADPH oxidase-catalyzed oxidative burst reaction.

Second, the alterations in calcium homeostasis may also be an important factor in cellular integrity and contribute to ROS production. Involvement of ROS in muscular injury occur due to organ ischemia and its subsequent reperfusion.⁶ Under

hypoxic conditions, xanthine dehydrogenase changes into its oxidase form. The conversion of the enzyme is mediated by the calcium-dependent protease calpain.³⁵ Then, upon reoxygenation, a xanthine oxidase uses molecular oxygen as an electron acceptor with the formation of the superoxide radical.⁶ Therefore, muscle injury leads to ischemia and impaired calcium homeostasis due to excessive impact on muscle and may increase ROS generation via the XO pathway.

In addition to ROS being produced by xanthine oxidase, it has been postulated that they might also be produced during direct interaction with electrons and be partly accumulated in intermediates of the anaerobic metabolism, with oxygen molecules. Besides, neutrophils have been reported to be attracted to and activated by superoxide produced by the endothelial xanthine oxidase during reperfusion.³⁶

Thus, the decrease of the superoxide anion observed in figure 1 after application of TPU plus DMSO gel may be due to effects of DMSO on the release of cytosolic calcium. Meis³⁷ and Velasco¹⁶ suggested that DMSO might enhance calcium accumulation in the sarcoplasmic reticulum and thereby reduce available cytosolic calcium concentrations. Thus, DMSO acts in the traumatic muscle lesion when there is an inflow of calcium into of the cell. Additionally, DMSO can block calcium release, inhibit xanthine oxidase activity, and reduce ROS production.^{38,39}

The increased activities of the antioxidant enzymes in skeletal muscle in response to muscular injury are associated with ROS production. In the present study, SOD and CAT activities in the gastrocnemius muscle were significantly increased when compared to the sham group (figure 2A and 2B). However, only SOD activity in the group exposed to TPU plus DMSO gel shows a significant decrease. SOD is an enzyme capable of reducing the superoxide radical to hydrogen peroxide (H₂O₂), which is the substrate to CAT. When the cell has decreased levels

of SOD without a proportional decrease in peroxidases, cells face a peroxide overload challenge.⁴⁰ In addition to inflammatory response and xantine oxidase activity, high levels of CAT activity suggest that other mechanisms may be involved in ROS production, e.g. the mitochondrial electron transport chain, the cytochrome P-450 system, and arachidonate oxygenases. This is important since peroxide can react with transitional metals and generate the hydroxyl radical, which is the most harmful radical to cellular constituents.⁶

Free radical-mediated lipid peroxidation, protein oxidation, and oxidative damage to nucleic acids are considered crucial events of the cytotoxic actions of ROS. Easily oxidizable fatty acids of membrane phospholipids are a good target for peroxidative attack, leading to alterations of membrane permeability and fluidity. That in turn may result in dysfunction of proteins, such as ionic pumps, whose activity depend on the membrane lipid milieu.³⁶

Ours results shown an increase in lipid peroxidation and protein carbonylation after muscular injury and these oxidative damages were significantly decreased only after TPU plus DMSO gel exposure (figure 3A and 3B). It is possible that the effect of DMSO on calcium release can also justify this reduction by preventing ROS formation. In addition, ultrasound alters the activity of platelets, neutrophils, and macrophages involved in the inflammatory phase of the muscle healing process, speeding up this process. Another effect is the increase in the speed of angiogenesis.⁴¹

In conclusion, our results show that DMSO is effective in reducing muscle lesion and oxidative stress after mechanical trauma only when used with TPU. Additional studies with other markers of oxidative stress and different types of muscle lesions are necessary to elucidate the exact mechanisms of this therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), CAPES and Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

REFERENCES

- 1 Li G. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiol Res*. 2005;54:193-199.
- 2 Pattwell DM, Jackson MJ. Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*. 2004;32:14–18.
- 3 Elmali N, Esenkaya I, Karadag N, et al. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2007;13:274-280.
- 4 Schaser KD, Bail HJ, Schewior L, et al. Acute effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle microcirculation following closed soft tissue trauma in rats. *J Orthop Res*. 2005;23:231–241.
- 5 Bar-Shai M, Carmeli E, Ljubuncic P, et al. Exercise and immobilization in aging animals: The involvement of oxidative stress and NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:202–214.
- 6 Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology Medicine* University Press, Oxford, NY. 2007.
- 7 Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration os skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci*. 2001;16:44-51.

- 8 Minamoto VB, Grazziano CR, Salvini TF. Effect of Single and Periodic Contusion on the Rat *soleus* Muscle at Different Stages of Regeneration. *Anat Rec.* 1999;254:281-287.
- 9 Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train.* 2002;37:293-299.
- 10 Markert CD. Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86:1304-1310.
- 11 Watson T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics.* 2008.
- 12 Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, et al. Effects of Therapeutic Ultrasound on the Regeneration of Skeletal Myofibers After Experimental Muscle Injury. *Am J Sports Med.* 1999;27:54 – 59.
- 13 Paliwal S, Mitragotri S. Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. *Ultrasonics.* 2008.
- 14 William D. O'Brien J. Ultrasound–biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;93:212–255.
- 15 Goraj-szczypiorowska B. Evaluation of factors influencing the quality and efficacy of ultrasound and phonophoresis treatment. *MedSportpress.* 2007;5:449 – 458.
- 16 Velasco R, Trujillo X, Vasquez C. Effect of Dimethyl Sulfoxide on Excitation-Contraction Coupling in Chicken Slow Skeletal Muscle. *J Pharmacol Sci.* 2003;93:149 – 154.
- 17 Mohanraj P, Merola J, Wright VP, et al. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. *J Appl Physiol.* 1998;84:1960-1966.

- 18 Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSF, et al. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. *Lasers Surg Med.* 2006;38:704–713.
- 19 Oliver IT. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J.* 1955;61:116 -122.
- 20 Rosalki SB. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *J Lab Clin Méd.* 1967;69:696 - 705.
- 21 Mccord, JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244:6049–6055.
- 22 Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 1990;186:421-431.
- 23 Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990;186:464-478.
- 24 Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Meth Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
- 25 Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 1984;105:121-126.
- 26 Lowry OH, Rosebough NG., Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
- 27 Craig JA, Bradley J, Walsh DM, et al. Delayed Onset Muscle Soreness: Lack of Effect of Therapeutic Ultrasound in Humans. *Arch Phys Med Rehabil.* 1999;80:318 – 323.
- 28 Karnes JL, Burton HW. Continuous Therapeutic Ultrasound Accelerates Repair of Contraction-Induced Skeletal Muscle Damage in Rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 2002;83:1 – 4.

- 29 Reid MB, Moody MR. Dimethyl sulfoxide depresses skeletal muscle contractility. *J Appl Physiol.* 1994;76:2186–2190.
- 30 Mariano AC, Alexandre GMC, Silva LC. Dimethyl sulphoxide enhances the effects of Pi in myofibrils and inhibits the activity of rabbit skeletal muscle contractile proteins. *Biochem J.* 2001;358:627 – 636.
- 31 Camici GG, Steffel J, Akhmedov A, et al. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation. *Circulation.* 2006;114:1512-1521.
- 32 Supinski GS, Callahan LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol.* 2007;102:2056–2063.
- 33 Kerkweg U, Petrat F, Korth HG, et al. Disruption Of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. *SHOCK.* 2007;27:552 – 558.
- 34 Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, et al. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:617–622.
- 35 Iwamoto H, Miura T, Okamura T, et al. Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33:580—586.
- 36 Juránek I, Bezek S. Controversy of Free Radical Hypothesis: Reactive Oxygen Species – Cause or Consequence of Tissue Injury? *Gen Physiol Biophys.* 2005;24:263—278.
- 37 Meis L. Control of heat production by the Ca^{+2} - ATPase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1998;274:1738-1744.

- 38 Ruigrok TJC, Moes D, Slade AM, et al. The effect of dimethylsulfoxide on the calcium paradox. *Am Ass Pathol.* 1981;103:390 – 403.
- 39 Ramirez-Silva L, Oria-Hernández. Selectivity of pyruvate kinase for Na⁺ and K⁺ in water/dimethylsulfoxide mixtures. *J Eur J. Biochem.* 2003;270:2377–2385.
- 40 Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int.* 2006;10:848-53.
- 41 Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC, et al. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biology International.* 2007;31:482 – 488.

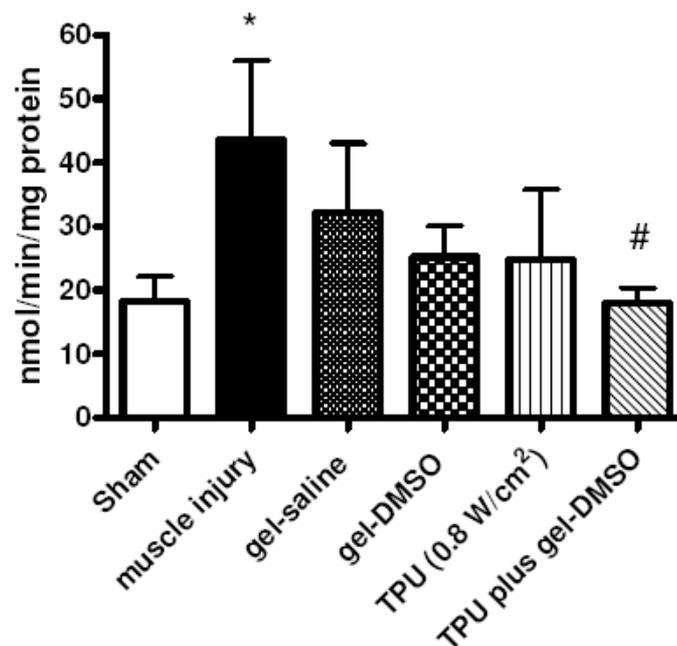
TABLE 1

Groups	CK (U/L)	Acid phosphatase (U/L)
Sham	98.52±46.24	25.63±2.73
muscle injury	158.31±29.66 *	34.40±1.77 *
Gel-saline	137.05±26.15	32.30±1.77 *
Gel-DMSO	102.96±77.40 #	37.2±2.44 *
TPU + gel-saline	125.58±23.26	35.59±2.29 *
TPU + gel-DMSO	104.25±43.21 #	27.09±3.08 #

Note: Values are presented as mean±SEM

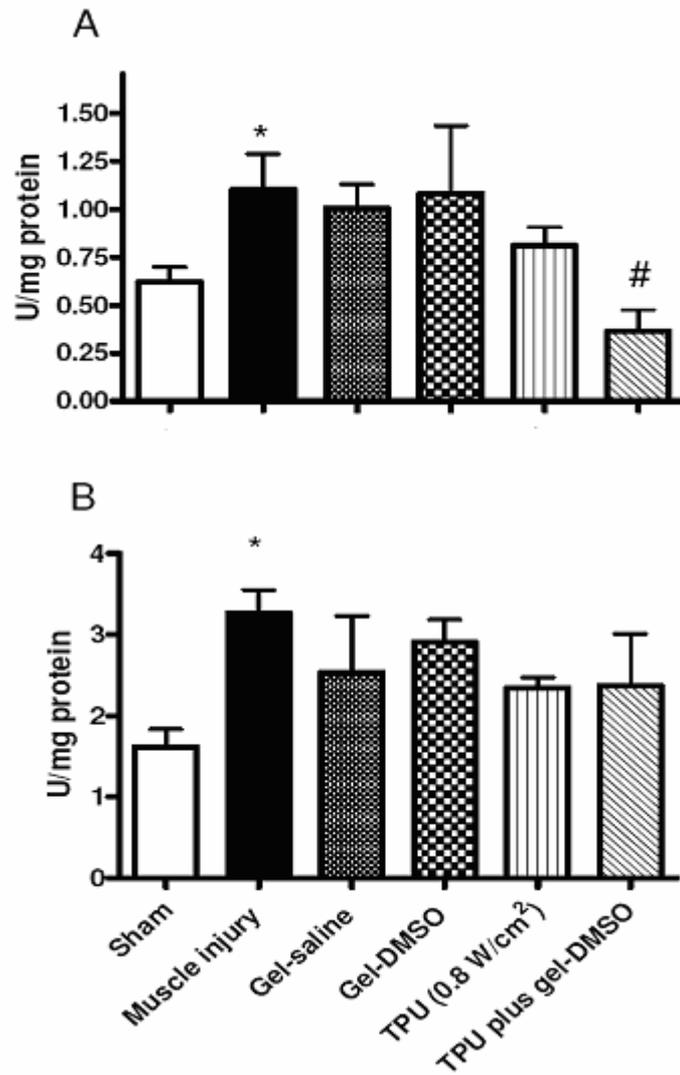
* Significant difference as compared to sham

Significant difference as compared to muscle injury without treatment

Figure 1

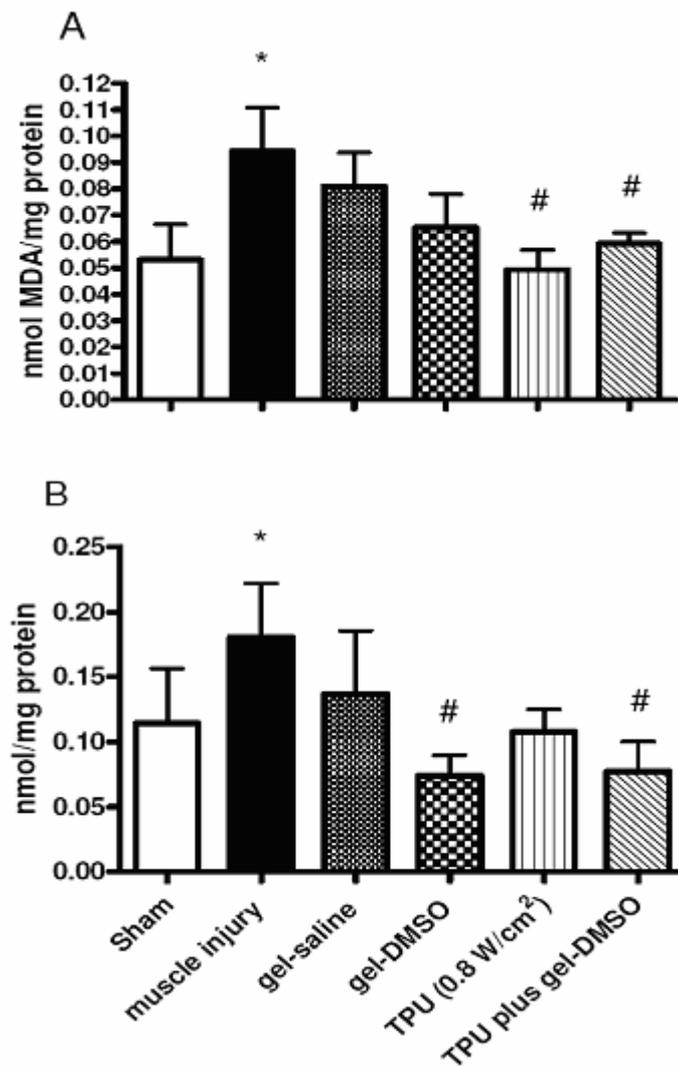
Effect of TPU plus gel-DMSO on anion superoxide production in skeletal muscle after injury (5 days). Data are expressed as mean±SEM for six animals. Different from sham (* $p < 0.05$) and different from muscle injury without treatment (# $p < 0.05$) (LSD test).

Figure 2



Effect of TPU plus gel-DMSO on superoxide dismutase (A) and catalase (B) activities in skeletal muscle after injury (5 days). Data are expressed as mean \pm SEM for six animals. Different from sham (* p <0.05) and different from muscle injury without treatment (# p <0.05) (LSD test).

Figure 3



Effect of TPU plus gel-DMSO on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (A) and protein carbonyl (B) in skeletal muscle after injury (5 days). Data are expressed as mean \pm SEM for six animals. Different from sham (* p <0.05) and different from muscle injury without treatment (# p <0.05) (LSD test).

CAPÍTULO III
EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (AsGa) NA LESÃO MUSCULAR
TRAUMÁTICA.

Submetido a Revista Brasileira de Fisioterapia

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (AsGa) NA LESÃO MUSCULAR
TRAUMÁTICA.**

PAULO CESAR LOCK SILVEIRA¹, LUCIANO ACORDI DA SILVA¹, CLEBER
AURINO PINHO¹, EMILIO STRECK², RICARDO AURINO PINHO¹.

¹ Universidade do Extremo Sul Catarinense, Laboratório de Fisiologia e Bioquímica
do Exercício, Criciúma, SC

² Universidade do Extremo Sul Catarinense, Laboratório de Fisiopatologia
Experimental, Criciúma, SC

ENDEREÇO:

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

Av. Universitária, 1105 – Bairro Universitário

88806-000 - Criciúma – SC/Brasil

e-mail: silveira_paulo2004@yahoo.com.br

RESUMO

Contextualização: Muitos estudos têm demonstrado um aumento nas Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e marcadores de danos oxidativos após dano muscular. Recentes achados demonstram que a terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) modula muitos processos bioquímicos principalmente diminuição de danos musculares, aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP acelerando o processo de cicatrização. **Objetivo:** verificar a influência da LLLT em parâmetro de dano muscular (CK), danos oxidativos, atividade antioxidante e síntese de colágeno após lesão muscular traumática. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar machos foram divididos randomicamente em tres grupos (n=6): Sham (musculo sem lesao); lesão muscular sem tratamento e lesão muscular com LLLT (AsGa) 5 J/cm². Foram irradiados 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas apos o trauma muscular. A atividade da CK no soro foi usada como indicador de lesão muscular. Anion superóxido, TBARS, carbonilacao de proteínas, atividade da superóxido dismutase e catalase foram usados como indicadores de estresse oxidativo. Níveis de hidroxiprolina foi utilizado para avaliar a síntese de colágeno. **Resultados:** o uso da LLLT melhorou a cicatrização muscular. Alem disso, diminuiu significativamente a produção de anion superóxido, níveis de TBARS, atividade da superóxido dismutase e síntese de colágeno. **Conclusão:** a lesão muscular traumática leva ao aumento na produção de ERO e consequentemente uma elevada síntese de colágeno e que a LLLT agiu de forma parcial nesses parâmetros.

Palavras Chave: LLLT, dano muscular, estresse oxidativo e síntese de colágeno

ABSTRACT

Introduction: Many studies have demonstrated an increase in Reactive Oxygen Species (ROS) and oxidative damage markers after muscle damage. Recent studies demonstrate the low-level laser therapy (LLLT) modulate many biochemistry process mainly decrease of muscular injuries; increase of mitochondrial respiration and synthesis of ATP acceleration the process healing. **Objective:** verify the influence of LLLT in parameter of muscular injury (CK), oxidative damage, antioxidant activity and synthesis of collagen after traumatic muscular injury.

Materials and Methods: Male Wistar rats were divided randomly into three groups (n=6): sham (uninjured muscle); muscle injury without treatment; muscle injury with LLLT (AsGa) 5 J/cm². LLLT was used 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hours after muscle trauma. The CK activity in serum was used as an indicator of skeletal muscle injury. Superoxide anion, TBARS, protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity was used as indicators of oxidative stress. Levels of hydroxyproline was used to assess the synthesis of collagen. Results: the use of LLLT enhance the muscular healing. More that, decreased significantly the production of superoxide anion, level of TBARS, superoxide dismutase activity and synthesis of collagen. Conclusion: the traumatic muscular injury induced the increase in the production of ROS and consequently high synthesis of collagen and LLLT act the partial form in these parameters.

Key Words: LLLT, muscle damage, oxidative stress and collagen synthesis

INTRODUÇÃO

A musculatura esquelética possui funções primárias como atividade locomotora, sustentação postural e respiração. É suscetível a trauma direto (atividade física intensa ou lacerações) e ao resultado de causas indiretas como disfunções neurológicas ou erros genéticos inatos¹.

As lesões traumáticas provocam danos envolvendo ruptura capilar, hemorragia, edema e inflamação, levando a formação de hematoma e podendo causar síndrome de comportamento em áreas onde o volume é limitado por planos fasciais. Os sintomas do dano por contusão são frequentemente não-específicos e incluem dor muscular em movimentos ativos e passivos e limitações na amplitude de movimento².

Adicionalmente, o dano muscular, de forma imediata, promove uma resposta isquêmica aguda liberando Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio³. Essas ERO também podem ser liberadas devido à migração, acúmulo e ativação de células polimorfonucleares. Essa cascata de eventos traz em consequência danos oxidativos a biomoléculas como lipoperoxidação da membrana celular, oxidação de proteínas, proteólises e fragmentação de DNA⁴. Consequentemente ocorre um desarranjo na integridade estrutural e na função celular do músculo, induzindo alterações na capacidade de transporte, produção de energia e balanço de íons⁵.

Recentes estudos demonstram que a terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) melhora significativamente o processo de regeneração muscular, induzindo miofibras novas⁶. Essa terapia modula muitos processos bioquímicos como aumento no sistema antioxidante, diminuição de danos musculares, reparo tecidual, ativação

de metaloproteases, aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP acelerando o processo de cicatrização⁷⁻¹⁰.

Assim, o objetivo desse estudo foi verificar a influência da LLLT em parâmetro de dano muscular (CK), danos oxidativos, atividade antioxidante e síntese de colágeno após lesão muscular traumática.

MATERIAIS E MÉTODOS

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 5 e dieta com água e ração comercial “*ad libitum*” e mantidos em um ciclo de 12 horas de claro/12 horas de escuro.

Os animais foram divididos randomicamente em 3 grupos (n=6): sham (músculo não lesionado); músculo lesionado sem tratamento; músculo lesionado com LLLT AsGa 5 J/cm². Esse estudo foi realizado de acordo com as orientações do COBEA e em conformidade com a lei 1153/2008 e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brazil, conforme parecer 630/07.

Modelo de lesão muscular

O modelo de trauma muscular foi descrito por Rizzi et al.¹¹. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg).

A lesão no gastrocnêmio foi realizada por um único impacto por trauma direto de uma 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. Os animais controles foram também anestesiados para assegurar a padronização, porém expostos ao equipamento sem o trauma muscular.

Tratamento

O tecido ao redor da lesão foi irradiado com laser AsGa com comprimento de onda de 904nm, forma de onda pulsada, feixe não visível e potência de pico de 15 a 30 W e densidade de energia de 5 J/cm². Foi realizada aplicação pontual, com a caneta mantida perpendicular à lesão com uma distância de 1 cm por ponto descrito por Morrone¹². Os animais foram irradiados 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o trauma.

Protocolo de Sacrifício

Duas horas após a última aplicação, os animais foram mortos por decapitação e o sangue foi coletado em tubos sem aditivos. A região da lesão no músculo gastrocnêmio (região lesionada) foi cirurgicamente removida. As amostras foram imediatamente processadas, alíquotadas e armazenadas em -70°C para posterior análise.

Preparação da amostra

Gastrocnêmio foi homogeneizado em tampão específico usado para cada técnica, através de potter (10x). O material homogeneizado foi centrifugado em 1000 X g a 4°C o sobrenadante foi mantido em -70°C para posteriores ensaios. O período máximo entre a preparação do homogeneizado e análises bioquímicas foi menor que 5 dias.

ENSAIOS

Níveis de Creatina Quinase (CK): A atividade da CK no soro foi usada como indicador de dano muscular. A reação incluía 100mM tampão Tris-HCL, pH 7,5, 30 mM fosfocreatina, 20 mM glicose, 12 mM acetato de magnésio, 10 mM diadenosina pentafofato, 15 mM azida sódica, 20 mM n-acetilcisteína, 2 mM ADP, 5 mM AMP, 2 mM NADP, 3500 U/L hexoquinase, 2000 U/L glicose-6-fosfato desidrogenase e aproximadamente 1,5 mg proteína, num volume final de 1200 µl. Atividade da creatina quinase foi calculada com base na formação de NADH monitorada com espectrofotometria a 340 nm a 37 C^{13,14}. Os resultados foram expressos em U/L.

Hidroxirolina: Os níveis de hidroxiprolina no tecido muscular foram usados como índice quantitativo de fibrogênese e fibrose. Foi determinado espectrofotometricamente como previamente descrito por Woessner¹⁵. Os resultados foram expressos em mg/g tecido.

Ânion Superóxido: As amostras do músculo foram homogeneizadas imediatamente após a extração e adicionado tampão MSTE, partículas submitocondrias foram isoladas. A produção foi determinada pela taxa de oxidação da adrenalina lido em

espectrofotômetro a 480nm conforme descrito por McCord¹⁶. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

Atividade da superóxido dismutase: Atividade da SOD foi avaliada pela inibição da oxidação de adrenalina com absorvância de 480 nm, como previamente descrita Bannister e Calabrese¹⁷. Os resultados foram expressos em U/mg proteína.

Atividade da Catalase: A atividade da CAT foi determinada pela queda na absorvância (240nm) correspondente ao consumo de peróxido de hidrogênio, conforme previamente descrito por Aebi¹⁸. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Lipoperoxidação: Como índice de peroxidação lipídica foi usado à formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante aquecimento como previamente descrito por Draper e Hadley¹⁹. As amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% em 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0.67%. Subseqüente, foram aquecidas a 100 C por 30 min. O nível de TBARS foi determinado por absorvância em 532nm usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Resultados foram expressos em nível de TBARS (nmol/mg proteína).

Carbonilação de proteínas: O dano oxidativo em proteínas foi mensurado pela determinação de grupos carbonis baseado na reação com dinitrofenilidrazina (DNPH)²⁰. Proteínas foram precipitadas pela adição de 20 % de ácido tricloroacético reagindo com DNPH. As amostras foram redissolvidas em guanidina (6M) e o conteúdo de carbonil foi determinado através da absorvância 370 nm usando um coeficiente de absorção molar de $22.0000M^{-1}$. Resultados foram expressos em conteúdo de carbonil (nmol/mg proteína).

Tratamento Estatístico: Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido

pelo teste post hoc LSD. 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.

RESULTADOS

Níveis de CK

Os resultados apresentados na tabela 1 mostram que a lesão muscular elevou significativamente os níveis de CK e que esses valores foram reduzidos quando expostos ao tratamento com LLLT.

Níveis de hidroxiprolina

Em relação à tabela 1 houve um aumento significativo na síntese de colágeno após 5 dias de lesão muscular sem tratamento. O grupo que recebeu LLLT teve uma diminuição significativa

Anion superóxido

Na figura 1 foi observado que a lesão muscular aumentou significativamente a produção de anion superóxido e a terapia com LLLT diminuiu significativamente esses valores.

Superóxido dismutase e Catalase

Em relação à figura 2A e 2B houve um aumento significativo nas atividades enzimáticas da CAT e SOD após 5 dias de lesão muscular sem tratamento. O grupo que recebeu LLLT teve uma diminuição significativa somente nos valores da SOD.

Peroxidação lipídica e Carbonilação de proteínas

De acordo com a figura 3A e 3B os níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas tiveram um aumento significativo após 5 dias de lesão muscular sem

tratamento. Em relação à lipoperoxidação o grupo que recebeu LLLT teve uma diminuição significativa. Em relação à carbonilação de proteínas não houve diferença.

DISCUSSÃO

O dano estrutural da musculatura esquelética e conseqüente capacidade de reparo e regeneração decorrem de eventos fisiológicos quem envolvem ruptura capilar, hemorragia, edema e inflamação². Adicionalmente, de forma imediata, a lesão por estímulo mecânico, promove ainda uma resposta isquêmica aguda liberando Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)³ que pode induzir à danos oxidativos a biomoléculas⁴ e conseqüente desarranjo na integridade estrutural e na função celular do músculo⁵. Dessa forma, a utilização de recursos terapêuticos no tratamento dessas lesões pode acelerar o processo de reparo e minimizar os efeitos deletérios da lesão. Assim, avaliamos os efeitos do laser de baixa intensidade sobre os parâmetros de dano muscular, síntese de colágeno e estresse oxidativo induzidos pela lesão muscular.

Inicialmente, avaliamos a atividade da creatina cinase (CK) no soro como marcador de dano muscular e os níveis de hidroxiprolina no tecido como marcador de síntese de colágeno. Como esperado, os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que ambos os marcadores elevam-se significativamente após a lesão e que o tratamento com a laserterapia de baixa potência diminui esses valores.

Resultados prévios têm demonstrado que a utilização da laserterapia promove o reparo e acelera a regeneração muscular²¹ o que possivelmente reduz os níveis sistêmicos de enzimas intracelulares. Adicionalmente, essa resposta

terapêutica estimula a síntese de fibroblastos²², a qual dá início a síntese de uma matriz extracelular provisória que é, subseqüentemente, substituída por uma matriz de colágeno. As fibrilas de colágeno, que se agregam para formar as fibras de colágeno, são insolúveis, altamente resistentes à tração, e efetivamente contribuem para o processo curativo pela reconstituição de tecidos lesados e conferindo resistência à tração em cicatrizes²³. Entretanto, a fibrogênese diminui a capacidade do tecido em exercer sua função contrátil. Assim, reduzir a síntese de colágeno sem comprometer o reparo do tecido é algo desejável.

De acordo com Fillipin et al.²⁴, a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) está diretamente envolvida nos processos regenerativos da lesão muscular. A presença de ERO é essencial para proteção da célula contra invasão de agentes infecciosos. Porém, quando em excesso, pode danificar biomoléculas e dificultar a recuperação do tecido lesionado^{25,26}.

Nossos resultados mostram um aumento na produção de ânion superóxido (figura 1) com concomitante aumento na atividade da SOD (figura 2B). A atividade da CAT não sofreu alteração significativa (figura 2A).

O aumento na produção de ânion superóxido no tecido lesionado e a redução induzida pelo laser podem estar associados a dois mecanismos principais. Primeiramente devido à respiração celular. O processo de reparo tecidual exige uma demanda maior de energia o que resulta num concomitante aumento de ânion superóxido. In vitro, Gimenez e Casado²⁷ demonstraram que a irradiação de baixa potência tem efeito bioestimulador, resultando num aumento do consumo celular de oxigênio e glicose. Entretanto, quando a irradiação excede 1 J/mg de tecido, essa resposta é inibida, diminuindo a respiração celular. E ainda, Karu²⁸ sugere que pelo fato da mitocôndria ser um fotoreceptor, a luz emitida pode causar uma ativação de

curto tempo na cadeia respiratória e oxidação da NADH. Isso provoca mudanças no estado redox da mitocôndria e citoplasma. A ativação da cadeia respiratória mitocondrial aumenta o potencial eletroquímico de produção do ATP²⁹.

Em segundo, a resposta inflamatória induzida pelo trauma provoca a migração de neutrófilos e macrófagos, as quais realizam um rápido consumo de oxigênio. Esse mecanismo ativa a NADPH-oxidase catalisando a transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio formando superóxido⁴. A LLLT diminui essa migração de neutrófilos e macrófagos e estimula atividade fagocitária de leucócitos, assim acelerando a duração da fase inflamatória^{7,30}.

O aumento na atividade da SOD (figura 2B) e sua redução após tratamento com laser está diretamente relacionado a produção concomitante de superóxido. A SOD é uma enzima capaz de reduzir o superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é substrato de peroxidases como a CAT e GPx. Quando há uma diminuição da SOD (figura 2B) sem uma diminuição proporcional da CAT (figura 2A), as células podem estar enfrentando um acúmulo de peróxidos³¹ que na presença de metais de transição formam o radical hidroxil, danificando constituintes celulares como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos⁴. Os resultados mostram um aumento nos níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas após a lesão muscular. Contudo, somente a lipoperoxidação foi significativamente reduzida após o tratamento com LLLT (figura 3A e 3B). Resultados similares de lipoperoxidação em gastrocnêmio também foram encontrados em um modelo de lesão isquêmica³² e por trauma mecânico¹¹. Embora alguns estudos tem demonstrado o potencial efeito positivo do LLLT sobre a produção de ERO^{6,8,12}, outros têm encontrado resultados contrários. Tem sido sugerido que a exposição ao laser pode aumentar a produção de ERO por acelerar a produção de superóxido^{33,34}. Esses resultados controversos podem

justificar os resultados diferenciados encontrados em nosso estudo no sistema enzimático antioxidante e nos níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. É possível que isso decorra da utilização de metodologias diferenciadas, especificamente a intensidade do laser, tempo de tratamento e o modelo de lesão utilizado para induzir ao trauma.

Conforme nossos resultados, concluímos que a lesão muscular traumática leva ao aumento na produção de ERO e conseqüentemente uma elevada síntese de colágeno e que a LLLT agiu de forma parcial nesses parâmetros. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos na recuperação do músculo esquelético após o tratamento por irradiação de baixa potência.

Agradecimentos: UNESC, CNPQ, CAPES

REFERENCIAS

1. Sophie BP, Rudnicki CM. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84:209–238.
2. Beiner JM, Jokl P. The Effect of Anabolic Steroids and Corticosteroids on Healing of Muscle Contusion Injury. *Am J Sports Méd.* 1997;27:2-9.
3. Bar-Shai M, Carmeli E, Ljubuncic P, et al. Exercise and immobilization in aging animals: The involvement of oxidative stress and NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:202–214.

4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical in Biology Medicine University Press, Oxford, NY. 2007.
5. Ozyurt B, Iraz M, Koca K. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in rats. *Mol Cell Biochem.* 2006;292:197–203.
6. Shefer G, Barash I. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1593:131– 139.
7. Demir H, Yaray S. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. 2004;41:721–728.
8. Medrado A, Pugliese LS, Reis SR. Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. *Lasers Surg Méd.* 2003;32:239–244.
9. Karu, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol.* 1999;49:1-17.
10. Gulsoy M, Dereli Z. Closure of skin incisions by 980-nm diode laser welding. *Lasers Med Sci.* 2006;21:5–10.
11. Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSF. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. *Lasers Surg Med.* 2006;38:704–713.
12. Morrone et.al. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In vivo experimental study. *Lasers Med. Sci.* 1998;13:293-298.
13. Oliver IT. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J.* 1955;61:116 -122.

14. Rosalki SB. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *J Lab Clin Méd.* 1967;69:696 - 705.
15. Mccord, JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J Biol Chem.* 1969;244:6049–6055.
16. 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.
17. Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Meth Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
18. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 1984;105:121-126.
19. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 1990;186:421-431.
20. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990;186:464-478.
21. Amaral, AC, Parizotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med. Sci.* 2001;16:44-51.
22. 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.
23. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med.* 2001; 33(1):7-21.
24. Fillipin LI, Mauriz JL. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized achilles tendon. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2005;37:293-300.

25. Kerkweg U, Petrat F, Korth HG. Disruption Of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. *SHOCK*. 2007;27:552 – 558.
26. Supinski GS, Callahan LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol*. 2007;102:2056–2063.
27. Karu T. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. *Proceedings of effects of low power light on biological systems*. 1995;2630: 2-9.
28. Karu, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *Journal of Quantum Electronics*. 1987;23:1703- 1717.
29. Yu W, Naim JO, McGowan M. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. 1997;66:866-871.
30. Ghamsari SM, Taguchi K, Abe N, Acorda JA, Sato M, Yamada H. Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness teat wounds in dairy cattle. *Vet Surg*. 1997;26:114–20.
31. Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*. 2006;10:848-53.
32. Avni D, Levkovitz S, Maltz L, Oron U. Protection of skeletal muscles from ischemic injury: Low-level laser therapy increases antioxidant activity. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23:273–277.
33. Yamaya M, Shiroto C, Kobayashi H, Naganuma S, Sakamoto J, Suzuki KJ, Nakaji S, Sugawara K. Mechanistic approach to GaAlAs diode laser effects on

production of reactive oxygen species from human neutrophils as a model for therapeutic modality at cellular level. *Laser Ther.* 1993;5:111–116.

34. Kim YG, Pak SC, Lee SR. Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-Ne laser. *Lasers Surg Méd.* 2000;27:420–426.

TABELA I

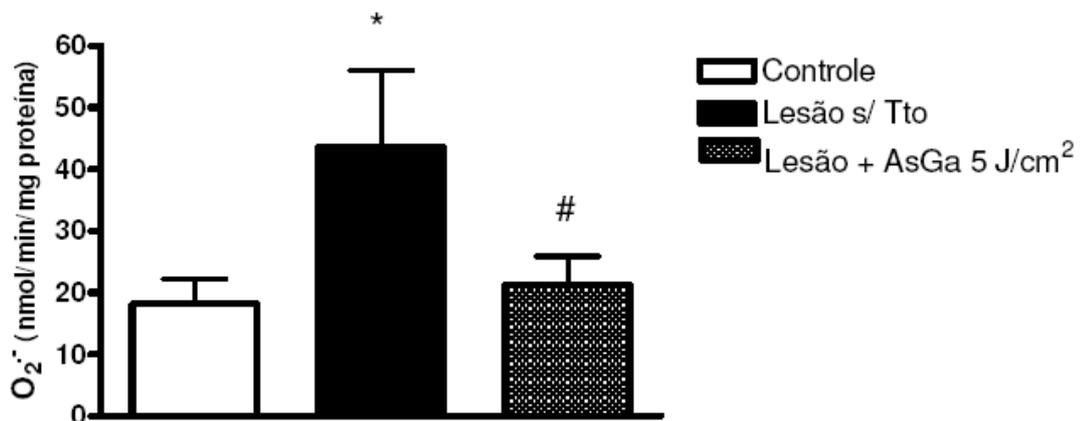
Grupos	CK (U/L)	Hidroxirolina (mg/g tecido)
Controle	98,52±46,24	561,86±35,93
Lesão s/ Tto	158,31±29,66 *	856,79±47,6 *
Lesão + AsGa 5 J/cm ²	103,44±22,47 #	540,1±38,68 #

Nota: Os valores são apresentados em média±EPM

* Diferença significativa em relação ao grupo controle

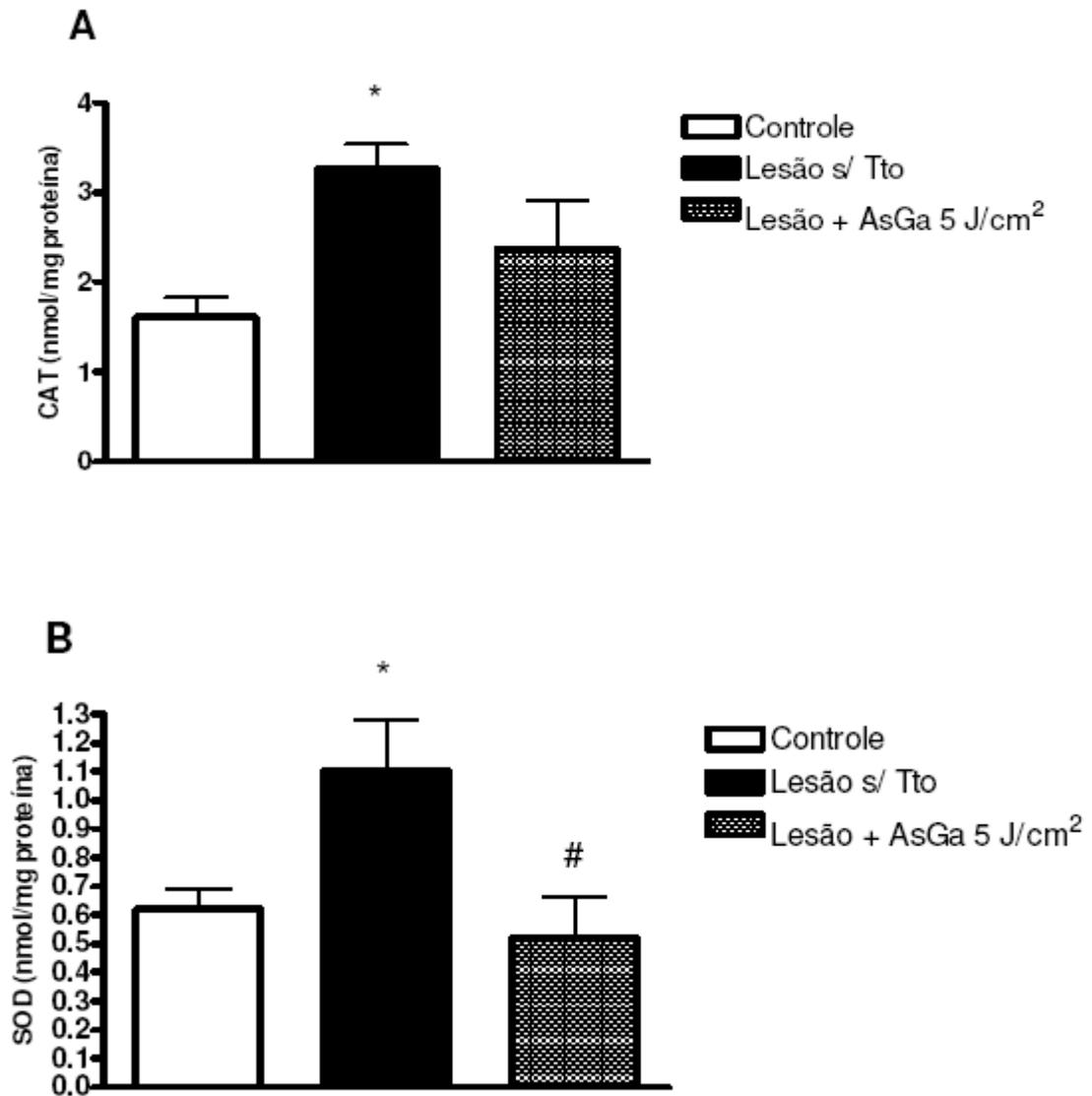
Diferença significativa em relação ao grupo lesão sem tratamento

FIGURA 1



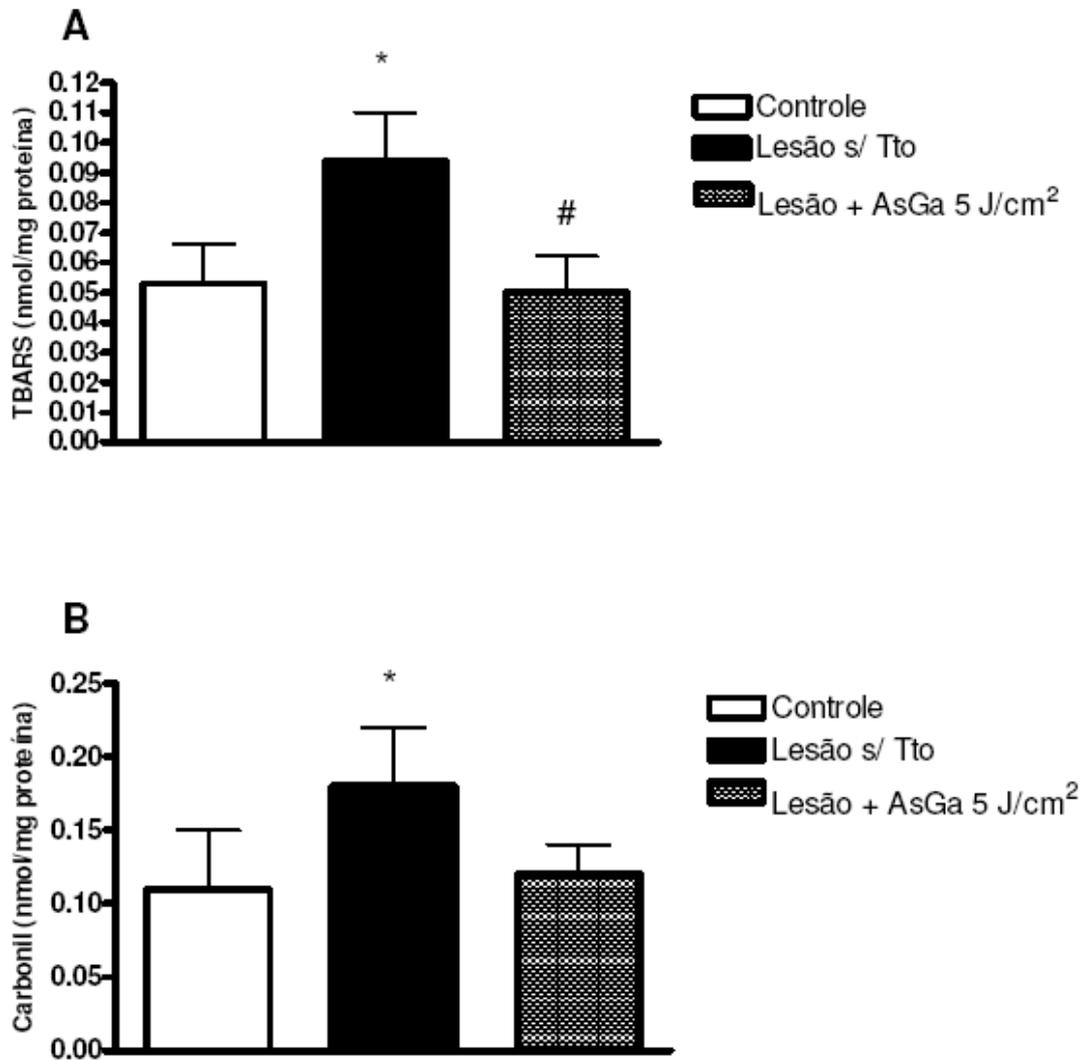
Efeitos da LLLT na produção de anion superóxido na lesão muscular traumática (5 dias). Dados são expressos em média±EPM para 6 animais. Diferente do grupo controle (*p<0.05) e diferente do grupo lesão muscular sem tratamento (#p<0.05) (teste LSD).

FIGURA 2A e 2B



Efeitos da LLLT na atividade da catalase (A) e superóxido dismutase (B) na lesão muscular traumática (5 dias). Dados são expressos em média±EPM para 6 animais. Diferente do grupo controle (* $p < 0.05$) e diferente do grupo lesão muscular sem tratamento (# $p < 0.05$) (teste LSD).

FIGURAS 3A e 3B



Efeitos da LLLT em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A) e carbonilação de proteínas (B) na lesão muscular traumática (5 dias). Dados são expressos em média±EPM para 6 animais. Diferente do grupo controle (* $p < 0.05$) e diferente do grupo lesão muscular sem tratamento (# $p < 0.05$) (teste LSD).

CAPÍTULO IV

Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscular healing by low-level laser therapy

Submetido a Physical Therapy

Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscular healing by low-level laser therapy

¹Paulo C.L Silveira, ¹Luciano Acordi da Silva, ²Daiane Fraga, ²Tiago P Freitas, ²Emilio L Streck, ¹Ricardo Pinho

1 Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

2 Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

Address:

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

Av. Universitária, 1105 – Bairro Universitário

88806-000 - Criciúma – SC/Brasil

e-mail: silveira_paulo2004@yahoo.com.br

ABSTRACT

Background: Many studies have demonstrated an increase in Reactive Oxygen Species (ROS) and oxidative damage markers after muscle damage. . Recents studies demonstrate the low-level laser therapy (LLLT) modulate many biochemistry process mainly decrease of muscular injures; increase of mitochondrial respiration and synthesis of ATP acceleration the process healing. **Objective:** In this work, we evaluated mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV and succinate dehydrogenase activities often traumatic muscular injury. **Methods:** Male Wistar rats were divided randomly into three groups (n=6): sham (uninjured muscle); muscle injury without treatment; muscle injury with LLLT (AsGa) 5 J/cm². Gastrocnemius injury was induced by a single impact blunt trauma. LLLT was used 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hours after muscle trauma. **Results:** our results showed that LLLT significantly increased the activities of complexes I, II, III, IV and succinate dehydrogenase activity. **Conclusion:** These results suggest that the treatment with low-level laser may induce an increase in ATP synthesis, and that this may accelerate the muscle healing process.

INTRODUCTION

Tissue repair is a dynamic interactive process, which involves several biochemical and cellular changes. Low level laser therapy (LLLT) is used in many biomedical sciences to promote tissue regeneration. Many studies involving the LLLT have shown that the healing process is enhanced by such therapy. In the last years, many researchers have described various important biological effects associated with LLLT¹⁻⁴.

LLLT has been used to treat muscular pain, although the biological mechanisms of the beneficial results observed in clinical trials remain unclear. The ability of LLLT to reduce the duration of acute inflammation and accelerate tissue repair in tendon and muscle injuries was proposed⁵⁻⁷. Lubart et al.⁸ suggested that LLLT may promote changes in the cellular redox state, playing a pivotal role in sustaining cellular activities, and promoting photobiostimulative processes.

Other studies, however, emphasize that depending on the applied dose, wavelength, irradiation time and also the conditions of the treated tissue, different biological answers can be achieved⁹⁻¹².

The aim of this work was to evaluate mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV and succinate dehydrogenase activities in traumatic muscular injury after irradiation with LLLT.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (250-300 g) obtained from the Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brazil were caged in groups of five and provided with commercial rat chow and water ad libitum and

maintained on a 12 h light/12 h dark cycle. The animals were divided randomly into three groups (n=6): sham (uninjured muscle); muscle injury without treatment; muscle injury with LLLT (AsGa) 5 J/cm². All studies were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of the Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brazil.

Muscle injury model

The muscle trauma model was described by Rizzi et al¹³. The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg). Gastrocnemius injury was induced by a single impact blunt trauma in a press developed by the Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brazil). Briefly, injury was produced by a metal mass (0.459 Kg) falling through a metal guide from a height of 18 cm. The impact kinetic energy delivered was 0.811 Joules. Control rats were also anesthetized to ensure standardization, but without muscle trauma.

Treatment

O tecido ao redor da lesão foi irradiado com laser AsGa com comprimento de onda de 904nm, forma de onda pulsada, feixe não visível e potência de pico de 20 W e densidade de energia de 5 J/cm². Foi realizada aplicação pontual, com a caneta mantida perpendicular à lesão com uma distância de 1 cm por ponto descrito por Morrone¹⁴. Os animais foram irradiados 2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o trauma.

Sample preparation

Two hours after to the last application, the animals were killed by decapitation and the blood was collected. The lesioned region of the muscle gastrocnemius was surgically removed and immediately processed, aliquoted and stored at -70°C for later analysis. Gastrocnemius was homogenized in the buffer used for each technique. The homogenates were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at 4°C and the supernatants kept at -70°C until used for the experiments. The maximal period between homogenate preparation and biochemical analysis was always less than 5 days.

Biochemical Assays

Activities of mitochondrial respiratory chain enzymes

Gastrocnemius was homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/ml heparin, pH 7.4). The homogenates were centrifuged at 800g for 10 min and the supernatants were used for determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities (complexes I, II, II–III and IV). In the day of the assays, the samples were freezed and thawed in hypotonic assay buffer three times to fully expose the enzymes to substrates and achieve maximal activities. NADH dehydrogenase (complex I) was evaluated according to the method described by Cassina and Radi¹⁵ by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm. The activities of succinate: DCIP oxidoreductase (complex II) and succinate: cytochrome c oxidoreductase (complex II–III) were determined according to the method of Fischer et al.¹⁶. Complex II activity was measured by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-

DCIP at 600 nm. Complex II–III activity was measured by cytochrome c reduction from succinate. The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin et al.¹⁷, measured by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were expressed as nmol/min/mg protein.

Protein Determination: The amount of protein in the samples tested for activities of mitochondrial respiratory chain enzymes was determined using the Lowry¹⁸ technique.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the LSD test when p values were significant ($p < 0.05$). All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software.

RESULTS

In this work, we measured mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV and succinate dehydrogenase activities in injured muscle after treatment with low-level laser for 5 days. We verified that the activities of complex II and succinate dehydrogenase after 5 days of muscular lesion were significantly increased when compared to the control group. Moreover, our results showed that LLLT significantly increased the activities of complexes I, II, III, IV and succinate dehydrogenase activity, when compared to injured-muscle without treatment group (Figures 1,2,3,4 and 5).

DISCUSSION

The inflammatory response to direct trauma as well as stretch injury consist of neutrophilia, neutrophil activation, and the accumulation of neutrophils within the injured muscle as early as one to two hours. In this early inflammatory stage, cellular debris is removed by the infiltrating neutrophils and is followed by a regenerative response during which satellite cells proliferate to replace the previously damaged and phagocytosed muscle¹⁹.

Skeletal muscle healing has three phases, where a substrate is laid down, then cells proliferate, and then there is remodeling of tissue. Evidence from literature suggests that laser biostimulation produces its primary effect during the cell proliferation phase of the muscular healing process. At cellular level, photo-irradiation at low power causes significant biological effects such as cellular proliferation, collagen synthesis, the release of growth factors from cells and macrophage and lymphocyte stimulation^{20,21}.

The results obtained in our work showed a significant increase in complexes I, II III, IV activities and succinate dehydrogenase activity in injured muscle after LLLT. The LLLT used in this study was a arsenium–gallium (AsGa) with a wavelength of 904 nm.

Several lines of evidence show that mitochondria are sensitive to irradiation with monochromatic visible light. The illumination of isolated rat liver mitochondria increases adenosine triphosphate (ATP) synthesis and the consumption of O₂. Irradiation with light at 904 nm increases the mitochondrial membrane potential and proton gradient, causes changes in mitochondrial optical properties, modifies some NADH-linked (NADH, reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide)

dehydrogenase reactions and increases the rate of ADP/ATP exchange (ADP, adenosine diphosphate)⁹.

Increased activity of mitochondrial electron transport can be associated with a variety of mitochondrial enzyme activities. Photostimulatory effects for a variety of mitochondrial enzymes (protein complexes in respiratory transport chain) have been proposed and studied by different researchers. However, most of the proposed mechanisms are based on oxygen consumption studies and lack of direct experimental support^{9,22,23}

Data from literature strongly suggest that cytochrome c oxidase (mitochondrial respiratory chain complex IV) is a key photoacceptor of light in the near infrared spectral range. We speculate that this enzyme could act in a similar way in the wavelength used in our work (904 nm)^{11,23}

Moreover, it was already demonstrated that 660 to 680 nm irradiation increased electron transfer in purified cytochrome c oxidase, mitochondrial respiration and ATP synthesis in isolated mitochondria and upregulated cytochrome c oxidase activity in cultured neuronal cells. It is also known that near-infrared light therapy results in initiation of a mitochondrial signaling cascade which promotes cellular proliferation and cytoprotection at cellular level^{9,12}.

When photons from laser light energize the metal sites in these complexes, shaking/vibration of these metals alter either the enzyme conformation or the redox reaction, and this in turn increases the transfer of electrons throughout the respiratory chain and/or pumping of protons across the inner mitochondrial membrane. Increased transference of electrons and protons accelerates oxidative metabolism and leads to an increase in ATP synthesis. Increased ATP production may in turn promote cellular metabolism. We speculate that the increase in ATP production due

to LLLT may induce acceleration in muscle healing process, especially in the inflammatory phase^{22,24,25}.

CONCLUSION

The present findings showed that LLLT increased the activity of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV, and succinate dehydrogenase. These results suggest that the treatment with low-level laser may induce an increase in ATP synthesis, and that this may accelerate the muscle healing process.

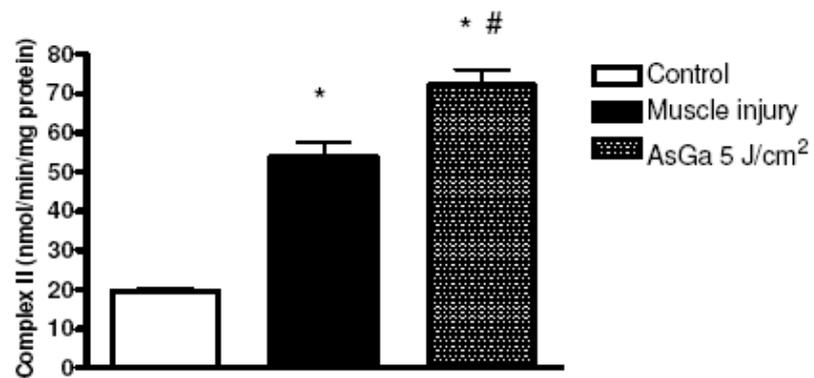
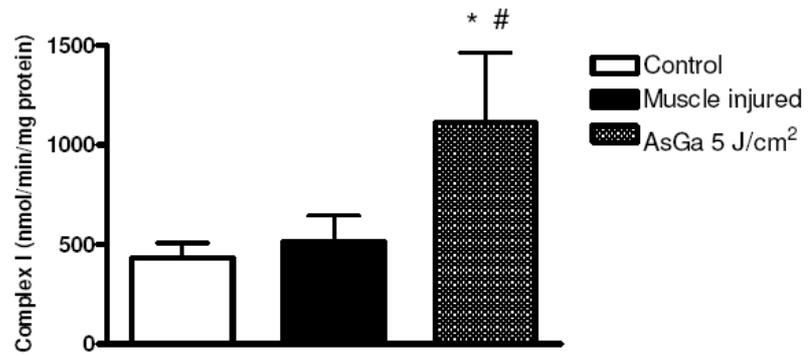
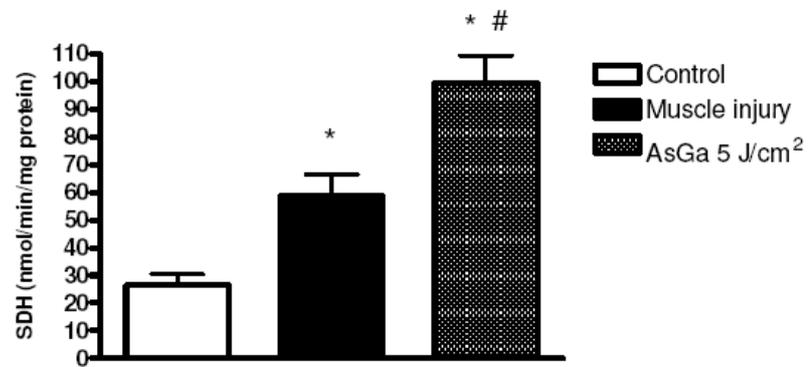
REFERENCES

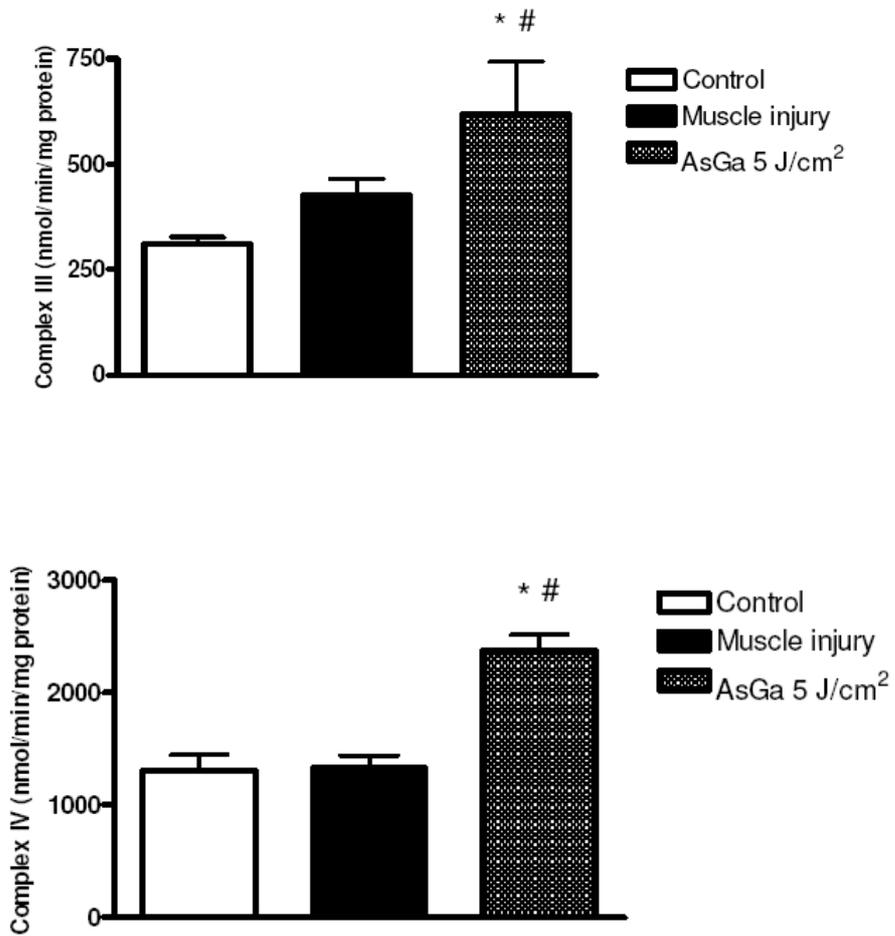
- 1 Carrillo JS, Calatayud J, Manso FJ, Barberia E, Martinez JM, Donado M. A randomized double-blind clinical trial on the effectiveness of helium-neon laser in the prevention of pain, swelling and trismus after removal of impacted third molars, *Int. Dent. J.* 1990;40:31–36.
- 2 Lilge L, Tierney K, Nussbaum E, Low-level laser therapy for wound healing: feasibility of wound dressing transillumination, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 2000;18:235–240.
- 3 Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M, Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation, *Lasers Surg. Med.* 2000;27:427–437.
- 4 Schlager A, Kronberger P, Petschke F, Ulmer H. Low-power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group. *Lasers Surg. Med.* 2000;27:39–42.
- 5 Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1056:486–93.
- 6 Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Surg Méd.* 2005;37:46–52.
- 7 Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg.* 2004;22:199–204.

- 8 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.
- 9 KARU, T. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. *Proceedings of effects of low power light on biological systems.* 1995;2630: 2-9.
- 10 M.T. Wong-Riley, X. Bai, E. Buchmann, H.T. Whelan, Lightemitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons, *NeuroReport.* 2001;12:3033–3037.
- 11 Wong-Riley MT, VerHoeve J, Henry M, Buchman EV. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion.* 2004;4:559–567.
- 12 Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSF, et al. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. *Lasers Surg Med.* 2006;38:704–713.
- 13 Morrone et.al. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In vivo experimental study. *Lasers Med. Sci.* 1998;13:293-298.
- 14 Cassina, A., Radi, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996;328:309–316.
- 15 Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle, *Clin. Chim. Acta.* 1985;153:23–26.
- 16 Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin. Chim. Acta.* 1994;228:35–51.
- 17 Lowry OH., Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-275.
- 18 Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br. J. Sports Med.* 2003;37;284-286.
- 19 Sommer AP, Pinheiro ALB, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. 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.
- 20 O'Brien TP, Li Q, Ashraf MF, Matteson DM, Stark WJ, Chan CC. Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy, *Arch. Ophthalmol.* 1998;116:1470–1474.

- 21 Yu W, Naim JO, McGowan M. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem and Photobio.* 1997;66:866-871.
- 22 Pastore D, Greco M, Passarella S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase, *Int. J. Radiat. Biol.* 2000;6:863–870.
- 23 Silveira PCL, Streck EL, PINHO RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *Photochem. Photobio.* 2007;86:279–282.
- 24 Hallen S, Brzezinski P. Light-induced structural changes in cytochrome c oxidase: implication for the mechanism of electron and proton gating. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994;1184:207-218.
- 25 GROSSMAN, N; SCHNEID, N. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med.* 1998;22:212-218.

Figures





Effect of low-level laser therapy on mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV and succinate dehydrogenase (SDH) activity in skeletal muscle after injury (5 days). Data are expressed as mean \pm SEM for six animals. Different from control (* p <0.05) and different from muscle injury without treatment (# p <0.05) (LSD test).

CAPÍTULO V
DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

O objetivo desta dissertação foi pautado nos possíveis efeitos da aplicação do laser de baixa potência e do ultra-som pulsado sobre os parâmetros de estresse oxidativo e sobre função mitocondrial muscular induzidos por trauma mecânico. Para tanto, partimos das seguintes evidências científicas:

- a) Após lesão traumática os marcadores de dano muscular apresentam um aumento significativo como mioglobina, fosfatase ácida e creatina quinase (MORRONE, 1998; HUARD, 2002).
- b) Após a lesão muscular inicial, o estresse oxidativo é aumentado devido a inúmeras fontes potenciais de geração de ERO dentro do músculo traumatizado (OZYURT, 2006).
- c) TPU é efetiva na redução da lesão muscular (KARNES, 2002).
- d) A LLLT age de forma parcial nos parâmetros de dano oxidativo (PALIWAL, 2008).
- e) A LLLT aumenta significativamente a produção de ATP no tecido lesionado (KARU, 1995).
- f) O DMSO possui propriedades antiinflamatórias (VIGNAUD, 2005) e *scavenger* de radical hidroxil (WAKATA, 2001).

A partir das evidências já apontadas na literatura, conforme citado anteriormente, objetivou-se neste estudo investigar se:

1 - o uso isolado do ultra-som ou associado com DMSO altera os marcadores de dano muscular, estresse oxidativo e acelera a recuperação do tecido.

2 – A laserterapia altera a função mitocondrial muscular após lesão mecânica.

De acordo com Fillipin *et al* (2005), a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) está diretamente envolvida nos processos regenerativos da lesão muscular. A presença de ERO é essencial para proteção da célula contra invasão de agentes infecciosos. Porém, quando em excesso, pode danificar biomoléculas e dificultar a recuperação do tecido lesionado (KERKWEG, 2007; SUPINSKI, 2007).

O dano muscular, de forma imediata, promove uma resposta isquêmica aguda liberando Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (BAR-SHAI, 2008). Essas ERO também podem ser liberadas devido à migração, acúmulo e ativação de células polimorfonucleares. Essa cascata de eventos traz em conseqüência danos oxidativos a biomoléculas como lipoperoxidação da membrana celular, oxidação de proteínas, proteólises e fragmentação de DNA (HALLIWELL B e GUTTERIDGE, 2007). Conseqüentemente ocorre um desarranjo na integridade estrutural e na função celular do músculo, induzindo alterações na capacidade de transporte, produção de energia e balanço de íons (OZYURT, 2006).

Durante a fase inflamatória, TPU possui efeitos estimulatórios em mastócitos, plaquetas e principalmente fagócitos e macrófagos. Devido ao aumento na atividade dessas células, certamente a influência principal do TPU é uma ação pró-inflamatória ao invés de antiinflamatória. Os benefícios deste modo de ação não são aumentar a resposta inflamatória e sim melhorar a intensidade deste estágio, agindo como um otimizador deste processo (WATSON, 2008; RANTANEN *et al*, 1999).

O papel do mecanismo não térmico do ultra-som na regeneração muscular e de tecidos moles está bem estabelecido. Em nível celular ocorrem mudanças na taxa de difusão e na permeabilidade de membrana para íons, devido ao fluxo

acústico e cavitação estável, podendo estimular células e aumentar a sinalização de moléculas (PALIWAL, 2008).

Devido a essas propriedades utilizamos o DMSO em conjunto com a TPU com intuito de potencializar os efeitos das duas terapias. Nossos resultados demonstram que houve uma redução significativa nos parâmetros de lesão muscular e estresse oxidativo.

O DMSO possui efeitos na liberação de cálcio podendo justificar essa redução na formação de ERO. Adicionalmente, o ultra-som altera a atividade de células polimorfonucleares envolvidas na fase inflamatória do processo de cicatrização muscular, acelerando este processo. Outro efeito dessa terapia é o aumento da velocidade de angiogênese (FREITAS, 2007; CAMICI, 2006).

Os resultados da LLLT mostraram alterações parciais na redução do estresse oxidativo, diminuição da síntese de colágeno e aumento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial.

Os efeitos biológicos da irradiação com laser de baixa potência dependem de vários fatores como característica, fonte de luz (comprimento de onda, dose e duração de pulso) e estrutura do tecido. Recentemente, a irradiação com laser de baixa potência tem sido usada para modular processos biológicos em humanos e animais (REZENDE, 2007). Muitos autores têm investigado os efeitos bioestimulatórios da aplicação laser em vários campos como pesquisas básicas, cultura de células, cicatrização muscular e de feridas, estimulação neural ou hormonal e diminuição de dor (LUCAS, 2000). Um dos principais usos da laserterapia é o tratamento de trauma muscular (MARRONE, 1998; AMARAL, 2001).

Alguns estudos demonstram uma redução do estresse oxidativo em diferentes situações como neutrófilos humanos isolados, durante cirurgia abdominal,

membranas de lipossomas e modelo animal de lesão tendinosa. Em relação à lesão muscular o laser possui efeitos positivos na síntese de colágeno e estresse oxidativo agindo na sinalização de NF-kB (RIZZI, 2006; FILLIPIN, 2005; WEISS, 1992; SHEFER, 2001).

Conforme Karu (1987), a irradiação causa um aumento no índice mitótico nas células de culturas irradiadas. Estes dados indicam que a irradiação causa um rearranjo no metabolismo celular, executando a função de ativador desse sistema. A resposta final da irradiação é a aceleração da proliferação.

CONCLUSÕES

Em resumo, sugerimos que o uso isolado TPU possui limitações no ataque de ERO após trauma muscular, e seu uso em conjunto com DMSO melhora os mecanismos de defesa por agir nas fontes primárias de produção ERO.

A LLLT foi efetiva no aumento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, provavelmente estimulando a síntese de ATP e acelerando o processo de cicatrização muscular. Já nos parâmetros de estresse oxidativo agiu de forma parcial, sendo necessária avaliação de outros parâmetros para confirmação de tal achado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERTINI R. Ànalise do efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. *Fisio Bras.* 2002;13:23-30.

ALSUP EM; DEBOWES RM. Dimethyl sulfoxide. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185:1011-1014. 1984.

AMARAL AC; PARIZOTTO NA; SALVINI TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration os skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci* 16:44-51. 2001.

BARREIROS ALBS; DAVID JM. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 29: 113-123. 2006.

BAR-SHAI M; CARMELI E; LJUBUNCIC P. Exercise and immobilization in aging animals: The involvement of oxidative stress and NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med* 44: 202–214. 2008.

BEST TM. Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *Am. Physio. Society* 53: 74-82. 1999. *Biology* 93:111–129. 2007.

BRAYTON CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Veterinarian* 76:76-90. 1986.

CAMICI GG; STEFFEL J; AKHMEDOV A. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation. *Circulation* 114:1512-1521. 2006.

CANNON JG; PIERRE BAS. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Molecular and Cellular biochemistry* 179: 159-167. 1998.

CARPENTER RJ; ANGEL MF; MORGAN RF. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. *Otolaryngology Head Neck Surgery* 110:228-231. 1994.

CRAIG JA; BRADLEYJ J; WALSH DM. Delayed Onset Muscle Soreness: Lack of Effect of Therapeutic Ultrasound in Humans. *Arch. Phys. Méd. Rehabil* 80: 318-323. 1999.

DALLE-DONNE I; GIUSTARINI D; COLOMBO R; ROSSI R; MILZANI A. Protein carbonylation in human Diseases. *TRENDS in Molecular Medicine* 2003.

DAVIES KJA; DHRINGARPURE R. Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and inflammatory neuromuscular diseases. *Neurology* 66: 93-96. 2006.

FILLIPIN LI; MAURIZ JL. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized achilles tendon. *Lasers in Surgery and Medicine* 37:293-300. 2005.

FLOHE, L. Glutathione peroxidase brought into focus. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, W. Pryor (ed.) p 223-253. Academic Press, New York. 1982.

FREITAS LS; FREITAS TP; SILVEIRA PC. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biology International* 31: 482 – 488. 2007.

FUKUSHIMA K; BADLANI N; USAS A. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med* 29: 394-402. 2001.

HAAR TG. Therapeutic applications of ultrasound. *Biophysics & Molecular*

- HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. Free Radical in Biology Medicine University Press, Oxford, NY. 2007.
- HILL GE; FENWICK S; MATTHEWS BJ. Ultrasound in Med. & Biol 31:1701–1706. 2005.
- HUARD J et.al. Muscle injuries and repair: current trends in research. The journal of bone and joint surgery 26:84-89. 2002.
- ILES KE; Forman HJ. Macrophage Signaling and Respiratory Burst. Immunol Res 26: 95-106. 2002.
- JARVINEN HU; TAH ET. Muscle Injures. Biology and treatment. The American journal of sports medicine 33:123-129. 2005.
- JI LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. J. Appl. Physiol 87: 465-470. 1999.
- KARNES JL; BURTON HW. Continuous Therapeutic Ultrasound Accelerates Repair of Contraction-Induced Skeletal Muscle Damage in Rats. Arch Phys Med Rehabil 83:1 – 4. 2002.
- KARU T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. J. Photochem. Photobiol 49:1-17. 1999.
- KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. Journal of Quantum Electronics 23: 1703- 1717. 1987.
- KERKWEG U; PETRAT F; KORTH HG. Disruption Of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. SHOCK 27:552 – 558. 2007.
- KITCHEN S; BAZIN S. Eletroterapia de Clayton. Editora Manole, São Paulo, 10^a edição, 1998.

- KOKSAL C; BOZKURT K. Attenuation of Ischemia/Reperfusion Injury by *N*-Acetylcysteine in a Rat Hind Limb Model. *Journal of Surgical Research* 111: 236–239. 2003.
- KÖNIG D; BERG A. Exercise and oxidative stress: Is there a need for additional antioxidants. *Österreichisches J. Für Sportmedizin* 3: 6-15. 2002.
- LI G. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiol Res* 54:193-199. 2005.
- LOW J; REED A. *Eletroterapia Explicada: princípios e prática*. Ed. Manole, São Paulo, pp. 187-228. 2003.
- LUCAS C; CRIENS, P. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level therapy; were clinical studies justified? A systematic review. *Lasers Med Sci* 17:110-134. 2002.
- MARKERT CD. Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration. *Arch Phys Med Rehabil* 86:1304-1310. 2005.
- MATSUBARA N; HIRAMATSU M; EDAMATSU R. Possible involvement of free radical scavenging properties in the action of tumor necrosis factor- α . *Free Radic Biol Med* 22: 679-87. 1997.
- MATSUO M; KANEKO T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, editor. *Free Radicals in Exercise and Aging Champaign: Human Kinetics* 78: 1-33. 2001.
- MEIS L. Control of heat production by the Ca^{+2} - atpase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol* 274:1738-1744. 1998.
- MOHANRAJ P; MEROLA J; WRIGHT VP. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 84:1960-1966. 1998.

- MORRONE et.al. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In vivo experimental study. *Lasers Med. Sci* 13: 293-298. 1998.
- musculoskeletal disorders. *Journal of the American Medical Association* 192: 309-313. 1965.
- NIELS BJ; VOLLAARD J; SHEARMAN P. Exercise-Induced Oxidative Stress. *Sports Méd* 35: 1045-1062. 2005.
- O'BRIEN TP; LI Q; ASHRAF MF; MATTESON DM; STARK WJ, CHAN CC. Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy, *Arch. Ophthalmol* 166:1470–1474. 1998.
- ORTIZ M; SANDOVAL C. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. *Fisio Brás* 23:87-92. 2001.
- OZYURT B; IRAZ M; KOCA K. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in rats. *Mol Cell Biochem* 292:197–203. 2006.
- PAGE S; POWELL M. Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. *Biochim. Biophys. Acta* 1381: 191-202. 1998.
- PALIWAL S; MITRAGOTRI S. Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. *Ultrasonics*. 2008.
- PATTWELL DM; JACKSON MJ. Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 32:14–18. 2004.
- Reduces Hydroxyl Radical Formation. *Neurochem Res* 26:841–844. 2001.
- REID MB; MOODY MR. Dimethyl sulfoxide depresses skeletal muscle contractility. *J Appl Physiol* 76:2186–2190. 1994.

REZENDE SBA; RIBEIRO MS. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: Biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol* 87:145–153. 2007.

RIZZI CF; MAURIZ JL; CORRÊA DSF. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. *Lasers Surg Med* 38:704–713. 2006.

ROBERTSON VJ; WARD DN. Dosage and treatment response in randomised clinical trials of therapeutic ultrasound. *Physical. Therapy. Sport* 3:124–133. 2002.

ROSENBAUM EE; HERSCHLER RJ; JACOB SW. Dimethyl sulfoxide in RUBIN LR. Toxicologic update of dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York*

SAY K; GONÇALVES G; Calvo T. O tratamento fisioterapêutico de úlceras cutâneas venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. *Rev Fisio Brás* 35:1-7. 2003.

SCOTT NA; JENNINGS PE; BROWN J; BELCH JJ; GLICLAZIDE. A general free radical scavenger. *Eur J Pharmacol* 208: 175-7. 1991

SILVEIRA PCL; STRECK EL; PINHO RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *Photochem. Photobio* 86:279–282. 2007.

SOMMER AP; PINHEIRO ALB; MESTER AR; FRANKE RP, H.T. Whelan, 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. 2001.

STARKEY C. Recursos terapêuticos em fisioterapia. Ed. Manole, São Paulo, pp. 304-311. 2002.

SUPINSKI GS; CALLAHAN LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol* 102: 2056–2063. 2007.

TIDBALL JG; WEHLING-HENRICKS M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* 102:1677–1686. 2007.

TOUMI H; BEST TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br. J. Sports Med* 37;284-286. 2003.

URSO ML; CLARKSON PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189:41-54. 2003.

VELASCO R; TRUJILLO X; VASQUEZ C. Effect of Dimethyl Sulfoxide on Excitation-Contraction Coupling in Chicken Slow Skeletal Muscle. *J Pharmacol Sci* 93:149 – 154. 2003.

VIGNAUD A, CEBRIAN J, MARTELLY I. Effect of anti-inflammatory and antioxidant drugs on the long-term repair of severely injured mouse skeletal muscle. *Exp Physiol* 90: 487–495. 2005.

WAKATA N; SUGIMOTO H; IGUCHI H. Bupivacaine Hydrochloride Induces Muscle Fiber Necrosis and Hydroxyl Radical Formation-Dimethyl Sulphoxide

WILKIN LD, MERRICK MA; KIRBY TE. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 25:73-77. 2004.

ZHAO K; ZHAO G; WU Z. Cell-permeable Peptide Antioxidants Targeted to Inner Mitochondrial Membrane inhibit Mitochondrial Swelling, Oxidative Cell Death, and Reperfusion Injury. *J Biol Chem* 279:34682–34690. 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)