

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

TEREZA CRISTINA DOS REIS FERREIRA

**OS EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO E DA ANDIROBA
(*Carapa guianensis*) NA LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR CONTUSÃO NO
MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR DE RATO**

**SÃO PAULO, SP
2018**

TEREZA CRISTINA DOS REIS FERREIRA

**OS EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO E DA ANDIROBA
(*Carapa guianensis*) NA LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR CONTUSÃO NO
MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR DE RATO**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho para
obtenção do título de Doutora em Ciências da
Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal Junior

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Kátia Simone Kietzer

SÃO PAULO, SP
2018

Ferreira, Tereza Cristina dos Reis.

Os efeitos da terapia por fotobiomodulação e da andiroba (Carapa guianensis) na lesão muscular induzida por contusão no músculo tibial anterior de rato. / Tereza Cristina dos Reis Ferreira. 2018.

72 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Prof. Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal Junior.

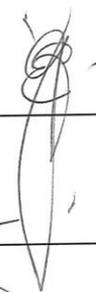
1. Terapia por fotobiomodulação. 2. Fototerapia. 3. Lesão muscular. 4. Contusão. 5. Andiroba.

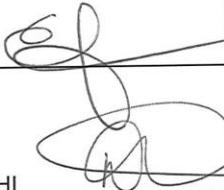
São Paulo, 11 de Junho de 2018.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Tereza Cristina Dos Reis Ferreira

Título da Tese: " Os efeitos de terapia por fotobiomodulação e da andiroba (*Carapa guianensis*) na lesão muscular induzida por contusão no músculo tibial de rato."

Presidente: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR _____ 

Membro: PROF. DR. EDUARDO FOSCHINI MIRANDA _____ 

Membro: PROFA. DRA. HELIODORA LEÃO CASALECHI _____ 

Membro: PROF. DR. LUCIO FRIGO _____ 

Dedico ao meu pai Francisco Pereira dos Reis (in memoriam) e minha mãe Tereza Luzia Sales dos Reis (in memoriam), por seu amor incondicional, por me ajudar a vencer meus limites, por me permitir conquistar vários sonhos, por estar ao meu lado nas maiores decisões da minha vida e por todos os valores éticos repassados do respeito ao outro. Não presentes em corpo neste momento, mas tenho certeza que em luz.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal Junior pela oportunidade, paciência e principalmente por toda confiança, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao Coordenador do programa de pós-graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de julho, Prof. Dr. João Ferrari.

A minha co-orientadora e amiga Dr^a Kattia Kietzer pela ajuda nos momentos de tensão e na confecção do projeto inicial, juntamente com o Dr. Jofre Jacob por permitirem eu adentrar o lar de vocês com assuntos acadêmicos.

Ao Coordenador do DINTER em Belém, Prof. Dr. Renato Teixeira.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso por disponibilizar a prensa lesional.

A Universidade Nove de Julho e seus professores, pois cada módulo contribuiu com o enriquecimento do nosso Saber.

As minhas irmãs: Telma, Triciane e Tatiana pela torcida, especialmente a Telma que me agasalhou em todos os módulos em São Paulo.

Aos meus filhos Marco Antônio e Rafaela pelos momentos de ausência, estresse e a depressão, foram meus anjos em todos os momentos, especialmente ao meu ex marido Edilson Rodrigues pela ajudada na superação de cada fase vivida, cada cirurgia, cada dor, cada choro, enfim por tudo que passamos

Aos companheiros de Laboratório de morfologia aplicada a Saúde da Universidade do Estado do Pará: Prof. MsC Pedro Iuri, as alunas de IC Janylle, Shaumim e Renata. Renata por toda as horas, por todas as 24h de convivência. Ao técnico de laboratório da UEPA - Marcio pela ajuda nas lâminas; ao Prof. MsC Luan Sena- pela análise físico química da andiroba e nas análises de SOD. Ao Prof. Dr. Edvaldo Silveira pela análise e leitura das lâminas. Aos seguranças da UEPA que nos protegiam nas noites e finais de semana; e todos que os funcionários que colaboraram.

Aos amigos do grupo AMIGOS DE QUALIDADE: Silene (mana como sempre vc é meu anjo da guarda), Lincoln, Marineuza, Luiza e Ana Rosa, pelo incentivo, pela torcida e por esses 15 a 24 anos de convivência.

Aos meus coordenadores que me liberaram para todas as fases necessárias em Belém e São Paulo, ao Centro Universitário do Pará (2004- 2017) nos nomes das Prof^a Dra Silene Castro e Prof^a MsC Cynthia Bentes; e aos Chefes do Departamento

de Ciências do Movimento Humano da Universidade do estado do Pará; Profª MsC Renata Amanajás e Prof Dr.Rodrigo Santiago (2015 a 2018); e as Coordenadoras do Curso de Fisioterapia da UEPA: Profª Drª Valéria Normando e Profª Drª Angelica Homobono (2015 a 2018). E ao amigo que muito me incentivou o Magnifico Reitor Prof Dr Juarez Quaresma, muito obrigada.

Aos alunos das IES que compreenderam os momentos de ausência.

Aos colegas de doutorado pelos momentos de descontração e tensões: André, Marileia(JADI), Ediléa. Erica, Dayse, Vanderson, Marcia Helena, Zaffarlon jr, Gileno, Alessandra, Roni, Rafael, Mariana e Evitom.

Aos meus Médicos Raphael Luna e Kleber Oliveira; e a minha terapeuta Léa Sales por toda ajuda, dedicação e incentivo nos momentos mais delicados.

Meu mais profundo agradecimento aos ratos de experimentação, que abriram o caminho das possibilidades e das descobertas deste estudo.

“...Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina...”
Cora Coralina

RESUMO

A atividade física, sistematizada e com acompanhamento profissional ou não profissional, está diretamente relacionada à qualidade de vida e à prevenção de doenças. No entanto, acompanhado desse crescimento, o número de lesões musculares também foi aumentado. Lesões musculares podem ser causadas por contusões, estiramentos ou lacerações. Mais de 90% de todas as lesões relacionadas a esportes são contusões ou estiramento. Concentrar-se em cuidados preventivos para reduzir o risco de lesão, a exposição à terapia de fotobiomodulação (TFBM), antes ou depois da atividade, pode proteger os tecidos vulneráveis dos danos induzidos pelo exercício e acelerar a recuperação. Fornece uma abordagem única, não invasiva e não farmacológica para reduzir a fadiga muscular. A andiroba (*Carapa guianensis*) é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada na Amazônia brasileira com conhecida atividade anti-inflamatória e ampla indicação em doenças de pele. O óleo de andiroba é rico em ácidos graxos essenciais, incluindo o ácido linoléico, que tem efeito sobre o transporte lipídico e o metabolismo in vivo, bem como para manter a função e a integridade das membranas celulares. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da TFBM e óleo de andiroba sobre marcadores de estresse oxidativo, análise histológica e níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratos após lesão do músculo tibial anterior. Ratos tratados com TFBM e óleo de andiroba (concentração de 50%) apresentaram redução na peroxidação lipídica 6 e 24 horas após o dano muscular. O aumento da glutathione peroxidase foi observado no grupo TFBM, e aumentou a superóxido dismutase em TFBM e TFBM mais óleo de andiroba 48 horas após a lesão. A análise histológica mostrou discreto edema nos grupos TFBM e TFBM e óleo de andiroba. A necrose foi observada apenas no grupo com lesão tecidual. Uma redução estatisticamente significativa de IL-6 e TNF- α foi observada 6, 24 e 48 horas após a lesão no grupo TFBM e óleo de andiroba. Nossos achados sugerem uma associação positiva de TFBM e óleo de andiroba na diminuição da produção de mediadores inflamatórios. No entanto, mais estudos são necessários para concluir a associação positiva entre TFBM e óleo de andiroba. Este fato pode favorecer as comunidades ribeirinhas que já utilizam o óleo de andiroba diariamente, além de proporcionar à comunidade científica novas opções de tratamento, uma vez que os efeitos antiinflamatórios da TFBM não são questionáveis, mas sua associação com plantas medicinais é questionável. ainda uma nova abordagem terapêutica, com baixos custos e baixos efeitos colaterais.

Palavras-chaves: Terapia por fotobiomodulação. Fototerapia. Lesão Muscular. Contusão. Andiroba

ABSTRACT

Physical activity, whether systematized and with professional or non-professional follow-up, is directly related to quality of life and disease prevention. However, accompanied by this growth, the number of muscular injuries was also increased. Muscle injuries can be caused by bruising, stretches or lacerations. More than 90% of all sports-related injuries are bruises or sprains. Focusing on preventive care to reduce the risk of injury, exposure to photobiomodulation therapy (PBMT), pre- or post-activity, can protect vulnerable tissues to exercise-induced damage and *speeding up recovery*. It provides unique, non-invasive and non-pharmacological approach to reducing muscle fatigue. Andiroba (*Carapa guianensis*) is a medicinal plant traditionally used in the Brazilian Amazon region with known anti-inflammatory activity and extensive indication in skin diseases. Andiroba oil is rich in essential fatty acids, including linoleic acid which has effect on *lipid transport and metabolism in vivo*, as well as for maintaining the function and integrity of cell membranes. *The aim of this study was to analyze the effects of PBMT and andiroba oil on oxidative stress markers, histological analysis and proinflammatory cytokine levels from rats after injury to the anterior tibialis muscle. Rats treated with PBMT plus andiroba oil (50% concentration) showed a reduction in lipid peroxidation 6 and 24 hours after muscle damage. Increased of glutathione peroxidase was observed in PBMT group, and increased superoxide dismutase in PBMT and PBMT plus andiroba oil 48 hours post-injury. The histological analysis showed discrete edema in the PBMT and PBMT plus andiroba oil groups. Necrosis was observed only in the group with tissue injury. A statistically significant reduction in IL-6 and TNF- α were observed 6, 24 e 48 hours after injury in the PBMT plus andiroba oil group. Our findings suggest a positive association of PBMT and andiroba oil in decrease the production of inflammatory mediators. However, further studies are necessary in order to conclude the positive association between PBMT and andiroba oil. This fact may favor riparian communities that already uses andiroba oil on a daily basis injuries, as well as to provide to the scientific Community with new treatment options, since the anti-inflammatory effects of PBMT are not questionable, but its association with medicinal plants is still a new therapeutic approach, with low costs and low side effects.*

Key- words: Photobiomodulation therapy .Phototherapy .Skeletal muscle injury .Contusion. Andiroba

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros da Terapia de Fotobiomodulação (TFBM)	22
Tabela 2	Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	29
Tabela 3	Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	29
Tabela 4	Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no sangue de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	30
Tabela 5	Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no sangue de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	31
Tabela 6	Mensuração da catalase no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	31
Tabela 7	Mensuração da catalase no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	32
Tabela 8	Mensuração da glutathione peroxidase no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	33
Tabela 9	Mensuração da glutathione peroxidase no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	33
Tabela 10	Mensuração da superóxido dismutase no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	34
Tabela 11	Mensuração da superóxido dismutase no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	34
Tabela 12	Avaliação quanto a presença ou ausência de edema nas lâminas da histologia do músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	35

Tabela 13	Avaliação quanto a presença ou ausência de necrose nas lâminas da histologia do músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	36
Tabela 14	Avaliação quanto a presença ou ausência de infiltrado celular nas lâminas da histologia do músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	36
Tabela 15	Parâmetros da Terapia de Fotobiomodulação (TFBM)	44
Tabela 16	Mensuração dos níveis de IL-6 no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	50
Tabela 17	Mensuração dos níveis de IL-6 no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	51
Tabela 18	Mensuração dos níveis de TNF- α no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	51
Tabela 19	Mensuração dos níveis de TNF- α no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)	52

SUMARIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	13
1.1	LESÃO MUSCULAR.....	13
1.2	INFLAMAÇÃO MUSCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO.....	14
1.3	INFLAMAÇÃO MUSCULAR x INTERLEUCINAS.....	15
1.4	TRATAMENTO.....	16
1.4.1	Terapia por fotobiomodulação.....	16
1.4.2	Andiroba.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
3	RESULTADOS.....	19
3.1	ESTUDO I.....	19
3.1.1	Introdução.....	19
3.1.2	Materiais e Métodos.....	20
3.1.2.1	Aspectos éticos e modelo experimental.....	20
3.1.2.2	Animais	20
3.1.2.3	Grupos experimentais.....	20
3.1.2.4	Indução da lesão muscular por contusão.....	21
3.1.2.5	Tratamentos.....	21
3.1.2.5.1	Terapia por fotobiomodulação (TFBM).....	21
3.1.2.5.2	Andiroba.....	23
3.1.2.5.3	Andiroba e Terapia por fotobiomodulação.....	25
3.1.2.6	Retirada do músculo, punção cardíaca, eutanásia e armazenamento.....	25
3.1.2.7	Histologia.....	25
3.1.2.8	Homogenização da amostra.....	26
3.1.2.9	Estresse Oxidativo.....	26
3.1.2.9.1	Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS (sangue e músculo).....	26
3.1.2.9.2	Catalase (CAT).....	27
3.1.2.9.3	Glutathione peroxidase.....	27
3.1.2.9.4	Superóxido dismutase (SOD)	28
3.1.2.10	Análise Estatística.....	28
3.1.3	Resultados.....	28
3.1.4	Discussão.....	37
3.1.5	Conclusão.....	41
3.2	ESTUDO II.....	41
3.2.1	Introdução.....	41
3.2.2	Material e Métodos.....	43
3.2.2.1	Aspectos éticos e modelo experimental.....	43
3.2.2.2	Animais.....	43
3.2.2.3	Grupos experimentais.....	43
3.2.2.4	Indução da lesão muscular por contusão.....	44
3.2.2.5	Tratamentos.....	44
3.2.2.5.1	Terapia por fotobiomodulação (TFBM).....	44
3.2.2.5.2	Andiroba.....	46

3.2.2.5.3	Andiroba e Terapia por fotobiomodulação.....	47
3.2.2.6	Retirada do músculo, eutanásia e armazenamento.....	48
3.2.2.7	Homogenização da amostra.....	48
3.2.2.8	Avaliação dos níveis de citocinas por meio do método de ELISA.....	48
3.2.2.9	Análise Estatística.....	49
3.2.3	Resultados.....	50
3.2.4	Discussão.....	52
3.2.5	Conclusão.....	55
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERENCIAS.....	57
	ANEXOS.....	68

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 LESÃO MUSCULAR

A ampla divulgação dos benefícios do exercício físico nos últimos anos tem cada vez mais adeptos que nem sempre procuram orientação, e mesmo quando orientados podem ser vitimados de lesão muscular. A atividade física, seja sistematizada e com acompanhamento profissional ou não, está diretamente relacionada à qualidade de vida e prevenção de doenças (1). Porém, acompanhado desse crescimento, aumentou-se também o quantitativo de lesões musculares (2;3).

Sabe-se que as lesões musculares podem ocorrer em diversas situações como na realização de movimentos de explosão muscular, por impacto direto, por alongamento excessivo de segmento e ainda em situações controladas – experimentação (4).

As lesões musculares podem ser causadas por contusões, estiramentos ou lacerações. Mais de 90% de todas as lesões relacionadas ao esporte são contusões ou estiramento. Já as lacerações musculares são as lesões menos frequentes no esporte (4;5). A contusão muscular ocorre quando o músculo é submetido a uma força compressiva e repentina, assim como uma pancada direta no músculo. A lesão muscular pode ser classificada em três graus: leve, moderada e grave. Lesão leve (grau I) ocorre por estiramento ou contusão apresentando lesões de poucas fibras musculares, pouco edema, desconforto acompanhado de nenhuma ou perda mínima de força muscular, apresentando pouca restrição de movimento. Lesão moderada (grau II) envolve maiores danos a musculatura com perda de função importante, pode apresentar contratura muscular. Lesão grave (grau III) considera-se uma lesão através de toda a secção transversa do musculo, resultando completa perda de função muscular (6;7;8;9).

Os sintomas da ocorrência de uma lesão muscular por impacto aparecem imediatamente após o trauma: dor na região do impacto, aumento no volume do músculo (causado por edema) e edema intersticial sem ruptura da fibra são característicos desse quadro. Os sinais clínicos provocam uma queda ou incapacidade de geração de força e redução da coordenação de movimentos, sejam estes para simples locomoção ou complexos movimentos esportivos (10). Qualquer que seja o objeto causador da lesão, as condições normais do tecido muscular são

danificadas e a funcionalidade da unidade passa a ser comprometida. Com o objetivo de reestabelecer as funções locais e o equilíbrio homeostático, imediatamente após a lesão inicia-se um intenso e importante processo inflamatório, seguido de reparo. A resposta inflamatória representa uma complexa interação do sistema imunológico envolvendo os componentes celulares, teciduais, de vascularização entre outros no tecido muscular esquelético (11).

Na prática esportiva de alto rendimento as lesões musculares também são comuns, sendo essencial monitoramento do sistema imune de atletas, bem como o treinamento, recuperação e nutrição, onde têm-se evidenciado grande importância na preparação para uma competição (12;13).

1.2 INFLAMAÇÃO MUSCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são espécies químicas originadas do processo de oxidação que ocorre de maneira natural ou por alguma disfunção biológica por meio de reações químicas que envolvam a presença de oxigênio, caracterizados pela presença de um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada de valência (14,15).

O termo radical livre é amplo para classificar as espécies de radicais livres produzidos no organismo, visto que há espécies que não apresentam elétrons desemparelhados, mesmo assim, apresentam grande potencial pró-oxidante das estruturas biológicas (15,16)

Após a lesão muscular inicial, ocorre indução de estresse oxidativo, fenômeno este que pode ser definido como um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os mecanismos de defesa e reparo contra esses compostos oxidantes. As fontes primárias de ERO incluem a mitocôndria, o aumento da atividade das enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase e ainda o metabolismo de prostanóides (17). As ERO são agentes oxidantes com alta reatividade, com capacidade de induzir modificações em biomoléculas que resultarão em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA (18).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela estabilização de radicais livres ocasionando uma redução e/ou inibição das lesões ocasionadas nos organismos pela ação dos radicais. Os antioxidantes desenvolvem sua ação mesmo estando em baixas concentrações, podem ser classificados como endógenos enzimáticos: Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e a glutatona reduzida (GSH) e endógenos não-

enzimáticos: bilirrubina, hormônios sexuais, melatonina. Coenzima Q, ácido úrico, entre outros; e antioxidantes exógenos: ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e grupos fenólicos, estes adquiridos na alimentação ou via suplementação alimentar (19, 20,21,22,23)

1.3 INFLAMAÇÃO MUSCULAR x CITOCINAS

A prática de exercício contínuo ou intermitente pode acarretar danos musculares acompanhados por processo inflamatório (24,25,26,27). Os prejuízos musculares induzidos podem gerar mutações agudas nas células do sistema imune, fadiga, perda de força, aumento de creatina quinase (CK) e citocinas inflamatórias na corrente sanguínea tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e as interleucinas-6 e 1- β (IL-6 e IL 1- β), além de causar dor muscular de início tardio (DMIT) (13, 28, 29, 30).

Os marcadores bioquímicos de lesão muscular e os sintomas do processo inflamatório apresentam pico entre 24 e 48 horas e podem causar fibrose deletéria ao tecido, acompanhada de redução da função muscular e perda de performance física por um período de 5 a 7 dias (13, 25, 29, 31, 32, 33).

Descrito em outros estudos o processo de cicatrização apresenta 3 fases distintas (4, 34,35):

Fase Degenerativa: caracterizada pela ruptura e subsequente necrose das fibras lesionadas, formação de hematoma e reação de células inflamatórias;

Fase de Reparo: consiste na fagocitose do tecido necrosado, regeneração das miofibras e produção de tecido conjuntivo bem como a revascularização capilar na área lesionada;

Fase de Reparo e Remodelamento: maturação e regeneração das miofibras, contração e reorganização do tecido cicatricial e restauração da capacidade funcional muscular.

Procurando reduzir os efeitos deletérios que a lesão muscular provoca ao indivíduo em um fundamento científico ainda maior para a escolha de cada conduta clínica, inúmeros pesquisadores buscam esclarecer os mecanismos da resposta inflamatória e do processo de regeneração iniciados após o dano tecidual muscular. As terapias utilizadas na medicina esportiva e reabilitação são diversas, dentre as quais podemos citar: terapia com ultrassom terapêutico, eletroterapia, RICE (repouso, gelo, compressão e elevação), fototerapia com laser de baixa potência (LBP), terapia

por Fotobiomodulação e a mais utilizada dentre todas, a terapia farmacológica (34,36, 37, 38, 39).

1.4 TRATAMENTOS

1.4.1 Terapia por fotobiomodulação (TFBM)

A terapia por fotobiomodulação era conhecida como terapia laser de baixa intensidade, e os primeiros dispositivos utilizados foram o laser de rubi (694 nm) e o laser HeNe (633 nm). A terminologia fotobiomodulação passou a ser usada recentemente, pois o termo baixo potência, era muito subjetivo. Durante muito tempo, o mecanismo de ação não estava claro, porém, nos últimos anos tem demonstrado ser uma interessante estratégia para acelerar o processo de regeneração tecidual e para reduzir a liberação de mediadores (40, 41,42,43, 44, 45).

De acordo com os autores, a terapia por fotobiomodulação não apresenta efeitos ablativos ou térmicos, mas tem efeitos fotoquímicos, onde a luz absorvida induz a alteração química nos tecidos. Geralmente é usado para a regeneração do tecido, reduzir o edema, inflamação e alívio da dor (46, 47, 48,49, 50).

Com foco atual em medidas preventivas para reduzir o risco de lesões, a exposição à terapia por fotobiomodulação, pré ou pós atividades, pode proteger os músculos vulneráveis a danos induzidos por exercício e recuperação de velocidade, a mesma, oferece meios único, não invasivo e não farmacológico de reduzir a fadiga muscular (38, 39, 43, 45,51, 52).

1.4.2 Andiroba

A descoberta de plantas com finalidade terapêutica é reportada desde antes de Cristo (a.C.) tendo sido inclusive descrito por Shen-Nung, considerado o pai da medicina chinesa tradicional, que utilizava curativos com plantas e escreveu um tratado denominado “O Herbário”, que menciona o uso de plantas. Durante vários séculos, a base terapêutica da prática médica foi à utilização de plantas medicinais, hoje denominadas como fitoterapia (53,54).

A andiroba (*Carapa guianensis*Aublet) foi descrita pela primeira vez em 1775 na Guiana Francesa pelo botânico francês Jean-Baptiste Christopher Fuscé Aublet. O óleo de andiroba é obtido das sementes que caem das árvores e possui alta viscosidade, é rico em estearina e outros ácidos graxos insaturados, principalmente

palmitico, esteárico, oléico, linoléico e behênico. Além disso, possui substâncias como triterpenos que tem ação anti-inflamatória (53).

A andiroba é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada na região amazônica brasileira. Desta planta é extraído o óleo de andiroba, que é composto por ácido mirístico (TCM), ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico. Além disso, apresenta Vitamina A e E, além de lecitina de soja. Apresenta ação antiinflamatória com extensa indicação em patologias de pele. O ácido Linoléico é importante para o transporte e metabolismo de gorduras, assim como, na manutenção da função e integridade das membranas (55).

Óleos de origem vegetal, tais como ácido oleico, linoleico e linolênico, são muito utilizados em ferimentos para auxiliar a cicatrização no Brasil (56). Os ácidos graxos apresentam 3 características: são componentes estruturais das membranas biológicas, mensageiros intracelulares e geram adenosina trifosfato (ATP). Os ácidos graxos interferem no processo inflamatório, sendo que a maioria destes eventos ocorre via ácido araquidônico como prostaglandinas, leucotrieno, tromboxanos e lipoxinas (57).

A utilização da Andiroba com o objetivo de melhorar o processo de cicatrização e no tratamento de feridas vem sendo foco de diversos estudos de vários pesquisadores dentre eles o de Brito et al (58), onde pesquisaram os efeitos da aplicação do óleo de Andiroba in natura em feridas cutâneas em ratos. Segundo os autores, apesar da confirmação dos efeitos anti-inflamatórios, a aplicação do mesmo gerou prejuízo no processo de cicatrização com retardo da contração e epitelização das feridas. Pennaforte (59) avaliou a atividade anti-inflamatória e analgésica de óleos de duas plantas amazônicas (copaíba e andiroba) e em seu estudo apresentou que o óleo de Andiroba possui atividade analgésica, antialérgica e anti-histamínica inibindo a formação de edema local.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos da terapia por fotobiomodulação e do óleo de andiroba na lesão muscular induzida por contusão no músculo tibial de rato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a Peroxidação Lipídica pelo método TBARS.
- Determinar os níveis de Enzima catalase, a atividade da glutathione peroxidase e do superóxido dismutase.
- Quantificar a presença ou ausência de edema, necrose e infiltrado celular por meio da análise histológica da amostra.
- Avaliar os níveis de citocinas (IL6 e tnf- α) por meio do método ELISA.

3 RESULTADOS

3.1 ESTUDO I – Os efeitos da terapia por fotobiomodulação e da andiroba (*carapa guianensis*) na lesão muscular induzida por contusão no músculo tibial de rato: Parte 1 - Estresse oxidativo e histologia

3.1.1 Introdução

As aplicações clínicas da terapia por fotobiomodulação (TFBM) vêm aumentando nos últimos anos nas mais diversas doenças. A TFBM empregando fontes de luz de baixa intensidade tem recebido interesse como estratégia preventiva e de recuperação de lesões induzidas por exercício físico ou trauma direto; por apresentar efeitos anti-inflamatórios, antálgicos e favorecer o reparo tecidual (39, 41,60, 61).

Os estudos de Borsa et al (51) e Leal- Junior et al (52), sugerem que os efeitos da TFBM na prevenção e recuperação do dano muscular induzido por exercício dependem da dose utilizada, sugerindo efeitos melhores quando utilizados 5 e 6 J/cm². Foi sugerido que pequenas doses de energia não possuem efeito, doses intermediárias gerem efeitos e doses mais elevadas possam inibir a atividade celular (48). Entretanto no estudo de Leal-Junior et al. (52) apontaram por meio de meta-análise que, embora doses de 5 e 6 J sejam consideradas ótimas para tratamento dos desfechos do dano muscular esquelético, existem resultados quando utilizadas doses anteriormente consideradas de efeitos desprezíveis (0,3 J por ponto de aplicação) quanto doses aparentemente exacerbadas (41,7 J por ponto de aplicação), porém ainda são necessários estudos com melhor controle metodológico para que se confirmem esses dados.

O Brasil é um País que apresenta crescentes avanços científicos não podendo deixar de relevar a diversidade cultural do seu povo, com suas peculiaridades regionais. Na Amazônia, mais especificamente nos estados do Pará e Amazonas, a população, de uma forma geral, costuma utilizar medicamentos fitoterápicos como plantas medicinais para o tratamento das mais variadas doenças. Esses conhecimentos empregados, empiricamente, no cotidiano de diversas pessoas são oriundos da herança cultural indígena, como terapêutica para reações inflamatórias agudas e crônicas. Dentre as plantas medicinais que são utilizadas com mais frequência na Amazônia, encontram-se a andiroba e a copaíba que possuem

crescente aplicação não só terapêutica, como, também, na indústria química e cosmética (58, 59,62).

O óleo da semente da andiroba é usado na medicina popular para diversas doenças como contusões, reumatismo, cicatrização, e afecções da garganta (faringite), dentre outras (58, 59,62).

O conhecimento dos mecanismos de ação da TFBM, bem como a elucidação dos efeitos na variação dos parâmetros de aplicação, sobre a recuperação muscular; associados as plantas medicinais ainda com poucos estudos a respeito, podem promover o avanço do conhecimento na área. Não obstante, a pesquisa experimental pode oferecer subsídios à realização de futuros ensaios clínicos com melhor controle metodológico para produzir prescrições terapêuticas e adequadas a técnica, além de possibilitar o desenvolvimento de novas associações aplicadas a recuperação do dano muscular.

3.1.2 Material e Métodos

3.1.2.1 Aspectos éticos e modelo experimental

Todos os animais foram cuidados segundo a legislação nacional para Procedimentos para o Uso Científico de Animais em vigor (Lei federal 11.794), o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade do Estado do Pará (UEPA) por meio do protocolo nº 24/2016.

3.1.2.2 Animais

Foram utilizados 65 ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar*, adultos, com idade média de 80 dias ou 10 semanas (adulto em fase reprodutiva) e pesando entre 280 a 350g; provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC) e transferidos ao biotério Luiz Carlos de Lima Silveira da Universidade do Estado do Pará (UEPA), onde foram alocados em gaiolas de acrílico apropriadas com fundo contendo maravalha, mantidos em ambiente de temperatura entre 22 e 25°C, recebendo água e ração *ad libitum* durante o período do experimento e ciclo de luz noite/dia de 12 horas (h).

3.1.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos por grupos aleatórios. Em 5 grupos experimentais com análises temporais compreendendo 06, 12 e 48hs em cada grupo, com 5 animais em cada análise temporal, totalizando 65 animais.

Os grupos experimentais foram utilizados de acordo com o protocolo de tratamento descrito abaixo:

1. Grupo Controle (n=5): grupo de animais que não foram submetidos a qualquer tipo de procedimento.
2. Grupo Lesão (n=15): animais foram submetidos apenas ao protocolo de lesão.
3. Grupo de tratamento com terapia por fotobiomodulação (n= 15): grupo de animais que foram submetidos à lesão e tratados com a TFBM.
4. Grupo de tratamento com óleo de andiroba (n=15): grupo de animais que foram submetidos à lesão e tratados com o óleo de andiroba.
5. Grupo de tratamento por terapia por fotobiomodulação e óleo de andiroba (n=15): grupo de animais que foram submetidos à lesão e tratados com a associação da TFBM e óleo de andiroba.

3.1.2.4 Indução da lesão muscular por contusão

Os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal (i.p) com uma associação de Ketamina e Xilazina (90 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente). Posteriormente, foram tricotomizados e foram randomizados em grupos e submetidos ao protocolo de lesão por contusão, onde os animais foram posicionados em decúbito dorsal com leve rotação interna da articulação do quadril e flexão plantar do tornozelo, para que a pata direita se posicionasse em extensão, apoiada na parte inferior da prensa lesionadora. Em seguida, um único trauma foi realizado utilizando uma prancha lesional, que compreende um bloco de peso de 200g com uma ponta chanfrada 2 mm de largura, deixada cair a partir de 20cm, guiadas por meio de suportes realizando a lesão em um único golpe no músculo tibial anterior.

3.1.2.5 Tratamentos

3.1.2.5.1 Terapia por fotobiomodulação (TFBM)

Os animais após uma hora da contusão foram imobilizados manualmente para receber uma única irradiação da TFBM em contato com a pele na região do ventre

muscular do musculo tibial anterior, sendo 3 subgrupos temporais de 6h, 24h e 48h, totalizando 15 animais. Posteriormente a cada fechamento do tempo de cada grupo os animais foram anestesiados para punção do sangue no ventrículo esquerdo, seguida de uma dose letal para eutanásia e retirada do músculo.

O equipamento foi do modelo MR4, com o cluster SE25, ambos fabricados pela empresa Multi Radiance Medical, fabricado em Solon - OH, USA, com os seguintes parâmetros (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros da Terapia de Fotobiomodulação (TFBM)

Número de lasers	1 Super - pulsado de infravermelho
Comprimento de onda (nm)	905 (± 1)
Frequência (Hz)	250
Pico de potência (W)	25
Average mean optical output (mW)	0.625
Densidade de potência (mW / cm ²)	1.42
Densidade de energia (J/cm ²)	0.011
Dose (J)	0.005
Tamanho do ponto de laser (cm ²)	0.44
Número de LEDs vermelhos	4 vermelhos
Comprimento de onda de LEDs vermelhos (nm)	640 (± 10)
Frequencia (Hz)	2
Comprimento de onda de LEDs vermelhos (mW) – cada	15
Densidade de potência (mW/cm ²) – cada	16.66
Densidade de energia (J/cm ²) – cada	0.133
Dose (J) – cada	0.12
Tamanho do ponto de LED vermelho (cm ²) –	0.9

cada	
Número de LED infravermelhos	4 Infravermelhos
Comprimento de onda de LED infravermelhos (nm)	875 (± 10)
Frequência (Hz)	16
Saída óptica média (mW) – each	17.5
Densidade de potência (mW/cm ²) – each	19.44
Densidade de energia (J/cm ²) – each	0.155
Dose (J) - each	0.14
Tamanho de ponto de LED (cm ²) – cada	0.9
Campo Magnético (mT)	35
Tempo de irradiação por site (s)	8
Dose total (J)	1.0
Dose total aplicada em grupo muscular (J)	1.0
Abertura do dispositivo (cm ²)	0.197
Densidade de potência do dispositivo (mW/cm ²)	663.07
Densidade de energia do dispositivo (J/cm ²)	5.07
Modo de aplicação	Cluster mantido estacionário em contacto com a pele com um ângulo de 90 graus e uma ligeira pressão

Fonte: Multi Radiance Medical - OH, USA

3.1.2.5.2 Andiroba

No grupo Andiroba, após uma hora da lesão por contusão os animais foram imobilizados manualmente para receber uma única aplicação tópica do óleo de

andiroba em contato com a pele na região do ventre muscular, sendo 3 subgrupos temporais de 6h, 24h e 48h, totalizando 15 animais. Posteriormente a cada fechamento do tempo de cada grupo os animais foram anestesiados para punção do sangue no ventrículo esquerdo, seguida de uma dose letal para eutanásia e retirada do músculo

A andiroba foi extraída e disponibilizada pela Empresa FAGRON e manipulada na farmácia da empresa para obter concentração de 50%.

Caracterização do óleo de Andiroba

A caracterização do óleo da Andiroba utilizado neste estudo foi realizada pelo Farmacêutico MsC Luann W.P de Sena (CRF/PA: 4082), Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Pará, colaborador no grupo do laboratório de Morfologia da Universidade do Estado do Pará (Quadro 1 e 2)

Quadro 1- Determinação de Ácidos graxos

Ácidos Graxos	Átomos de carbono	Composição percentual
Mirístico	14:00	0,33
Palmítico	16:00	28,03
Esteárico	18:00	8,69
Oléico	18:10	49,08
Linoleico	18:20	11,03
Linolênico	18:30	1,35
Araquídínico	20:00	0,22
Beênico	22:00	0,34

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

Quadro 2 - Dados Físico-Químicos do óleo de Andiroba

Índices	Unidades	Valores de Referência
Índice de Acidez	mg KOH/g	1,4 +/- 0,02
Índice de peróxido	Meq.peróx/100g amostra	5,76 +/- 0,004
Índice de saponificação	mg KOH/g	198,4 +/- 1,02
Índice de Iodo	gI ² /100g	69 +/- 0.09
Densidade	g/mL a 50°C	0,98 +/- 0,001

Índice de refração	50°C	1,468 +/- 0,008
--------------------	------	-----------------

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

3.1.2.5.3 Andiroba e Terapia por fotobiomodulação

Os animais após uma hora da lesão foram imobilizados manualmente para receber uma única irradiação TFBM em contato com a pele na região do ventre muscular, com os mesmos parâmetros do grupo TFBM e posteriormente a aplicação tópica do óleo de andiroba, semelhante ao grupo que somente recebeu a aplicação tópica do óleo, sendo 3 subgrupos temporais de 6h, 24h e 48h, totalizando 15 animais. Posteriormente a cada fechamento do tempo de cada grupo os animais foram anestesiados para punção do sangue no ventrículo esquerdo, seguida de uma dose letal para eutanásia e retirada do músculo.

3.1.2.6 Retirada do músculo, punção cardíaca, eutanásia e armazenamento

Após o período de tratamento, todos os animais, foram devidamente pesados e anestesiados com Ketamina e Xilasina via intraperitoneal, para realização da punção cardíaca. Na qual o animal ficava em decúbito lateral direito, entre o 4^o a 6^o espaço intercostal, ocorria a introdução da agulha previamente heparinizada no ventrículo esquerdo para aspiração de todo o sangue. Este foi submetido a centrifugação a 3000 rpm por cinco minutos, para obtenção do soro (63).

Posteriormente o animal recebeu uma dose letal de anestésico, sendo confirmada sua morte, seguiu realizando retirada do músculo tibial anterior (TA), onde durante a dissecação, os músculos foram periodicamente gotejados com solução salina (NaCl 0,9%), para evitar ressecamento tecidual. Em seguida, a área correspondente a lesão foi dividida ao meio, porção proximal e distal, com um corte transversal (63). A porção proximal foi utilizada para análise morfológica e a porção distal ainda foi dividida por um corte horizontal, sendo as partes armazenadas, cada uma, em eppendorf para a análise da peroxidação lipídica. Em seguida, os músculos e o soro do sangue centrifugado foram congelados e armazenados em freezer a -80°C.

3.1.2.7 Histologia

As amostras foram fixadas em formol a 10% pelo período de 24 a 48h. Em seguida, foram desidratadas em álcool etílico absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas

em parafina. Os blocos de parafina foram confeccionados e submetidos a microtomia a 5 µm. Os cortes histológicos em lâmina de vidro são submetidos à desparafinização em estufa a 80°C e em soluções de xilol. Em seguida, são hidratadas em álcool etílico absoluto e água corrente, para imersão em hematoxilina e eosina. Por fim, são desidratadas em álcool etílico absoluto e xilol, e é realizada a montagem com Bálsamo do Canadá e lamínula. Posteriormente as lâminas foram visualizadas no microscópio Nikon Eclipse E200, nas objetivas 4x, 10x e 40x, com luz polarizada, sendo a leitura realizada pelo Médico patologista Dr Edvaldo Lima Silveira (CRM2444), professor da Universidade do Estado do Pará e colaborador do Laboratório de Morfologia; sendo as anotações realizada pela autora do estudo quanto a presença ou ausência de edema, necrose e infiltrado celular.

3.1.2.8 Homogenização da amostra

A amostra do músculo tibial anterior coletado foi pesada em uma balança de precisão, sendo seu peso ideal esteja entre 0,5g a 0,098g, onde foi colocada a mesma quantidade de solução salina e submetida a homogeneização por meio de um homogeneizador automático durante 20 segundos. Posteriormente, foi realizada a centrifugação com parâmetros de 1200 rpm durante 3 minutos, após a centrifugação retirou-se à parte sobrenadante, a qual foi transferida para dois eppendorf, e sendo armazenados em um Freezer -80° até o dia da análise bioquímica (64).

3.1.2.9 Estresse Oxidativo

3.1.2.9.1 Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS (sangue e músculo)

Para se determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os produtos resultantes da peroxidação lipídica, foram utilizados o método de Winterbourn, Gutteridge e Halliwell (64) modificados para análise em espectrofotometria.

O método baseia-se na alteração da coloração da amostra (plasma) quando a mesma é colocada para reagir com o ácido tiobarbitúrico a 1 % na temperatura de 90 a 100 °C e em meio ácido. Em tubos de propileno (PP) de 1,5 ml, sendo colocados 10 µL de BHT (solução etanólica a 2 %), 200 µL de HCl 25%, 200 µL de solução de ácido tiobarbitúrico (1%) dissolvido em solução aquosa de NaOH a 0,05N e 200 µL de

amostra. Sendo um branco com todas as soluções colocando-se, no lugar da amostra, solução salina 0,9%.

Posteriormente, os tubos contendo a mistura foram incubados em banho fervente (100 °C) durante 15 minutos e resfriados em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 618 µL de butanol em cada tubo e agitará em vórtex até que houvesse a transferência total da coloração rósea da camada inferior para a superior. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 12000 rpm até que a fase do butanol (sobrenadante) torne-se límpida. Assim, retirou-se 200 µl de sobrenadante, e as amostras foram distribuídas em duplicata em uma placa de 96 poços. A placa foi introduzida em um espectrofotômetro, onde se mediu a absorbância ao comprimento de onda de 532 nm.

A amplificação da peroxidação durante o ensaio foi prevenida pela adição de um antioxidante (butil-hidroxi-tolueno- BHT). A concentração de TBARs foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do MDA ($\epsilon = 1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) (64).

Concentração de TBARs = Absorbância/1,56 x diluições

Para a determinação da concentração de proteínas das amostras foi utilizado como padrão de referência soluções de albumina sérica bovina fração V (Sigma) e a leitura da absorbância foi feita a 595 nm. A leitura foi realizada utilizando esse comprimento de onda, pois absorve a luz no espectro de cor azul, o que difere da técnica do TBAR's que absorve luz no espectro vermelho.

3.1.2.9.2 Catalase (CAT)

A determinação da enzima CAT realizou-se segundo a técnica de Aebi et al (65). Por meio desta metodologia avaliou se a capacidade da enzima presente na amostra converter H₂O₂ em água e oxigênio. A leitura do decaimento de H₂O₂ foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta a 240 nm e os valores de CAT foram expressos em unidade de catalase por g de proteínas (quantidade de catalase necessária para hidrolisar 1 µmol de H₂O₂ /min./g de proteína, à 37°C, pH 8).

3.1.2.9.3 Glutationa peroxidase

A determinação da atividade da glutatona peroxidase foi realizada de acordo com o método de Flohé e Gunzler (66), no qual a reação é baseada na redução do terc-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação da Glutationa reduzida (GSH) e

formação de Glutathiona oxidada (GSSG), catalisada pela Glutathiona peroxidase (GPx). Assim, a medida consiste na oxidação (verificada por meio da queda da absorbância) do Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) medido em 340 nm, uma vez que o NADPH é utilizado na regeneração da GSH pela enzima Glutathiona redutase (GR). Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, catalisada pela GPx presente na amostra analisada.

O procedimento técnico foi realizado por meio do preparo de um meio de reação contendo 25 mL de tampão fosfato (0,1 M pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA, 5 mM pH 7,0), 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH e 3,8 µL de GR 5U, sob refrigeração, no momento do ensaio. Posteriormente, em temperatura ambiente, foram adicionados 10 µL de amostra de tert-Butyl Hidroperoxide (t-BuOOH) em 1 mL de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.1.2.9.4 Superóxido dismutase (SOD)

A técnica para determinação do teor de sódio deu início com o procedimento de calcinação para determinação de cinzas a partir da higienização de cadinhos que foram colocados na mufla por 1 hora. Após esse período foram retirados da mufla e resfriado no dessecador por 1 hora. Foi feita a pesagem de 10 mg da amostra que foram liquidificado e diluído em água destilada e levada para o processo de carbonização no bico de bunsen. Após essa etapa, as amostras foram levadas para a mufla onde permaneceram até se tornarem cinzas aptas para análise.

A quantidade de sódio presente em cada amostra foi determinada por titulação com nitrato de prata, de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005).

3.1.2.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm EPM e submetidos ao teste Shapiro-Wilk, para verificação de normalidade. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do Programa Graph Pad Prisma 5, utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), para as comparações entre os grupos, seguidos da aplicação de pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância utilizado foi de 5%.

3.1.3 Resultados

A seguir apresenta -se os dados referentes as análises do estresse oxidativo e antioxidantes.

Em relação a mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no músculo obteve- se diferença estatisticamente significativa no grupo terapia por fotobiomodulação e andiroba nos tempos de 6h e 24h quando comparados aos demais grupos, não apresentando nenhum grupo diferença estatisticamente significativa nas 48h (Tabela 2). Quando a análise nos grupos foi realizada nos tempos de observação e o grupo controle evidencia-se diferença estatisticamente significativa no grupo terapia por fotobiomodulação e andiroba e no grupo lesão (Tabela 3).

Tabela 2- Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
6h	Controle	0.218	0.0402	0.17	0.28	0.0003*
	TFBM	0.208	0.0756	0.09	0.3	
	Andiroba	0.302	0.0944	0.22	0.46	
	TFBM e andiroba	0.108	0.0311	0.06	0.14	
	Lesão	0.334	0.0713	0.21	0.38	
24h	Controle	0.218	0.0402	0.17	0.28	0.0087*
	TFBM	0.248	0.1285	0.1	0.45	
	Andiroba	0.206	0.0537	0.13	0.28	
	TFBM e andiroba	0.104	0.02074	0.08	0.13	
	Lesão	0.394	0.1958	0.17	0.7	
48h	Controle	0.218	0.0402	0.17	0.28	0.0605
	TFBM	0.224	0.0658	0.13	0.3	
	Andiroba	0.35	0.283	0.14	0.83	
	TFBM e andiroba	0.394	0.0477	0.34	0.46	
	Lesão	0.442	0.0776	0.32	0.53	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova (p<0,05)

Tabela 3- Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
TFBM	Controle	0.218	0.0402	0.17	0.28	0.8914
	6h	0.208	0.0756	0.09	0.3	
	24h	0.248	0.1285	0.1	0.45	
	48h	0.224	0.0658	0.13	0.3	
Andiroba	Controle	0.218	0.0402	0.17	0.28	0.4132
	6h	0.302	0.0944	0.22	0.46	
	24h	0.206	0.0537	0.13	0.28	
	48h	0.35	0.283	0.14	0.83	
TFBM e andiroba	Controle	0.218	0.0402	0.17	0.28	<0.0001*
	6h	0.108	0.0311	0.06	0.14	
	24h	0.104	0.02074	0.08	0.13	
	48h	0.394	0.0477	0.34	0.46	
Lesão	Controle	0.218	0.0402	0.17	0.28	0.035*
	6h	0.334	0.0713	0.21	0.38	
	24h	0.394	0.1958	0.17	0.7	
	48h	0.442	0.0776	0.32	0.53	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Em relação a mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no sangue obteve-se diferença estatisticamente no grupo lesão no tempo de 24h, quando comparados aos demais grupos, não apresentando nenhum grupo diferença estatisticamente significativa nas 06h e 48h (Tabela 4). Quando a análise nos grupos foi realizada nos tempos de observação e o grupo controle evidencia-se diferença estatisticamente significativa no grupo lesão nas 24h (Tabela 5).

Tabela 4- Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no sangue de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
------------------	---------------	--------------	-----------	---------------	---------------	----------------

6h	Controle	1.50	0.46	1.18	2.28	0.6393
	TFBM	1.96	1.07	0.90	3.73	
	Andiroba	2.09	0.39	1.65	2.47	
	TFBM e andiroba	2.09	3.01	0.66	7.48	
	Lesão	0.87	0.46	0.34	1.55	
24h	Controle	1.50	0.46	1.18	2.28	0.0014*
	TFBM	2.38	1.09	1.65	4.30	
	Andiroba	1.50	0.53	0.98	2.32	
	TFBM e andiroba	1.31	1.48	0.56	3.95	
	Lesão	0.17	0.12	0.07	0.37	
48h	Controle	1.50	0.46	1.18	2.28	0.0607
	TFBM	2.21	1.16	1.46	4.25	
	Andiroba	1.13	0.70	0.00	1.82	
	TFBM e andiroba	0.79	0.29	0.49	1.15	
	Lesão	1.14	0.76	0.69	2.47	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Tabela 5 - Mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS no sangue de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Método	Intervalo	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor	
TFBM	Controle	1.50	0.46	1.18	2.28	0.5290	
	6h	1.96	1.07	0.90	3.73		
	24h	2.38	1.09	1.65	4.30		
	48h	2.21	1.16	1.46	4.25		
	Controle	1.50	0.46	1.18	2.28		
Andiroba	6h	2.09	0.39	1.65	2.47	0.0746	
	24h	1.50	0.53	0.98	2.32		
	48h	1.13	0.70	0.00	1.82		
	Controle	1.50	0.46	1.18	2.28		
	6h	2.09	3.01	0.66	7.48		0.6920
24h	1.31	1.48	0.56	3.95			
48h	0.79	0.29	0.49	1.15			
Lesão	Controle	1.50	0.46	1.18	2.28	0.0054*	
	6h	0.87	0.46	0.34	1.55		
	24h	0.17	0.12	0.07	0.37		
	48h	1.14	0.76	0.69	2.47		

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Em relação a mensuração de substâncias antioxidantes obteve-se que em relação a catalase não evidenciou-se diferença estatisticamente nos grupos em relação aos tempos de observação (Tabela 6); e nem nos grupos de tratamento quando analisados os tempos de observação e o grupo controle (Tabela 7).

Tabela 6 - Mensuração da catalase no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
6h	Controle	52.11	26.75	31.4	98.81	0.3489
	TFBM	58.17	19.88	34.79	89.88	
	Andiroba	29.574	16.41	3.44	48.60	
	TFBM e andiroba	61.756	40.62	21.06	128.79	
	Lesão	50.774	17.60	32.75	71.43	
24h	Controle	52.11	26.75	31.4	98.81	0.3160
	TFBM	39.49	5.56	36.79	49.43	
	Andiroba	54.236	11.67	42.36	73.78	
	TFBM e andiroba	36.61	12.07	18.48	47.13	
	Injury	45.078	16.33	34.82	73.86	
48h	Controle	52.11	26.75	31.4	98.81	0.2181
	TFBM	33.658	15.19	20.91	57.72	
	Andiroba	37.942	17.63	18.79	64.22	
	TFBM e andiroba	36.38	12.80	23.42	50.37	
	Injury	73.526	25.31	50.60	114.4	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.
Teste anova ($p < 0,05$)

Tabela 7- Mensuração da catalase no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
TFBM	Controle	52.11	26.75	31.4	98.81	0.2857
	6h	58.17	19.88	34.79	89.88	
	24h	39.49	5.56	36.79	49.43	
	48h	33.658	15.19	20.91	57.72	
Andiroba	Controle	52.11	26.75	31.4	98.81	0.5491
	6h	29.574	16.41	3.44	48.6	
	24h	54.236	11.67	42.36	73.78	
	48h	37.942	17.63	18.79	64.22	
TFBM e andiroba	Controle	52.11	26.75	31.4	98.81	0.4051

	6h	61.756	40.62	21.06	128.79	
	24h	36.61	12.07	18.48	47.13	
	48h	36.38	12.80	23.42	50.37	
	Controle	52.11	26.75	31.4	98.81	
Lesão	6h	50.774	17.60	32.75	71.43	0.0501
	24h	45.078	16.33	34.82	73.86	
	48h	73.526	25.31	50.6	114.4	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.
Teste anova ($p < 0,05$)

Quanto a mensuração da glutiona peroxidase evidenciou-se que no grupo TFBM apresentou diferença estatisticamente nas 48h em relação aos demais grupos no mesmo tempo de observação; e o Grupo Lesão nas 6h (Tabela 8); e quando analisados o grupo TFBM e andiroba nos tempos de observação e o grupo controle observa-se que o grupo controle apresentou diferença estatisticamente (Tabela 9).

Tabela 8 - Mensuração da glutiona peroxidase no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
6h	Controle	0.82	0.37	0.42	1.35	0.0386*
	TFBM	0.38	0.17	0.21	0.64	
	Andiroba	0.53	0.27	0.34	0.98	
	TFBM e andiroba	0.40	0.27	0.05	0.72	
	Lesão	1.35	1.83	0.39	4.61	
24h	Controle	0.82	0.37	0.42	1.35	0.2803
	TFBM	1.00	1.50	0.11	3.64	
	Andiroba	0.65	0.14	0.47	0.85	
	TFBM e andiroba	0.39	0.15	0.23	0.58	
	Lesão	0.32	0.25	0.02	0.59	
48h	Controle	0.82	0.37	0.42	1.35	0.0244*
	TFBM	0.92	1.52	0.08	3.61	
	Andiroba	0.88	0.21	0.58	1.16	
	TFBM e andiroba	0.56	0.17	0.34	0.75	
	Lesão	0.85	0.38	0.52	1.46	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.
*Teste anova ($p < 0,05$)

Tabela 9 - Mensuração da glutathiona peroxidase no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Método	Intervalo	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
TFBM	Controle	0.82	0.37	0.42	1.35	0.2702
	6h	0.38	0.17	0.21	0.64	
	24h	1.00	1.50	0.11	3.64	
	48h	0.92	1.52	0.08	3.61	
Andiroba	Controle	0.82	0.37	0.42	1.35	0.4059
	6h	0.53	0.27	0.34	0.98	
	24h	0.65	0.14	0.47	0.85	
	48h	0.88	0.21	0.58	1.16	
TFBM e andiroba	Controle	0.82	0.37	0.42	1.35	0.0008*
	6h	0.40	0.27	0.05	0.72	
	24h	0.39	0.15	0.23	0.58	
	48h	0.56	0.17	0.34	0.75	
Lesão	Controle	0.82	0.37	0.42	1.35	0.0902
	6h	1.35	1.83	0.39	4.61	
	24h	0.32	0.25	0.02	0.59	
	48h	0.85	0.38	0.52	1.46	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Quanto a mensuração da superóxido dismutase evidenciou-se que no grupo lesão apresentou diferença estatisticamente nos 3 tempos de observação (Tabela 10); e quando analisados o grupo TFBM e andiroba e TFBM nos tempos de observação e o grupo controle observa-se que o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa, em relação ao grupo Lesão observa-se que nas 06h foi estatisticamente diferente em relação aos outros tempos e o grupo controle (Tabela 11).

Tabela 10 - Mensuração da superóxido dismutase no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
6h	Controle	141.3	1.1	139.9	142.7	< 0.0001*
	TFBM	130.1	1.2	128.7	132.0	
	Andiroba	140.9	1	139.4	142.1	
	TFBM e andiroba	133.8	1.4	131.8	135	
	Lesão	163.7	2	161.8	166.7	
24h	Controle	141.3	1.1	139.9	142.7	< 0.0001*
	TFBM	130	1	129.3	131.8	
	Andiroba	140.7	1.6	138.1	142.2	
	TFBM e andiroba	134.2	1.2	133	136.1	
	Lesão	164.4	1.6	162.3	166.4	
48h	Controle	141.3	1.1	139.9	142.7	< 0.0001*
	TFBM	130.8	1.8	128.9	133.7	
	Andiroba	141.4	0.9	140.4	142.6	
	TFBM e andiroba	135	2.1	133	138.1	
	Lesão	161.7	1.4	160.3	163.5	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Tabela 11 - Mensuração da superóxido dismutase no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Método	Intervalo	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
TFBM	Controle	141.3	1.1	139.9	142.7	< 0.0001*
	6h	130.1	1.2	128.7	132.0	
	24h	130	1	129.3	131.8	
	48h	130.8	1.8	128.9	133.7	
Andiroba	Controle	141.3	1.1	139.9	142.7	0.8019
	6h	140.9	1	139.4	142.1	
	24h	140.7	1.6	138.1	142.2	
	48h	141.4	0.9	140.4	142.6	
TFBM e andiroba	Controle	141.3	1.1	139.9	142.7	< 0.0001*
	6h	133.8	1.4	131.8	135	
	24h	134.2	1.2	133	136.1	
	48h	135	2.1	133	138.1	
Lesão	Controle	141.3	1.1	139.9	142.7	< 0.0001*
	6h	163.7	2	161.8	166.7	
	24h	164.4	1.6	162.3	166.4	
	48h	161.7	1.4	160.3	163.5	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Em relação a análise histológica foram definidas a presença ou ausência de edema, necrose e infiltrado celular. Quanto a presença 100% da amostra de todos os grupos apresentaram edema, sendo edema leve para os grupos FTBM e FTBM e andiroba e os demais presença de edema (Tabela 12).

Tabela 12 – Avaliação quanto a presença ou ausência de edema nas lâminas da histologia do músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Presença	%	Ausência	%
6h	Controle	5	100.0	0	0.0
	TFBM	5	100.0	0	0.0
	Andiroba	5	100.0	0	0.0
	TFBM e andiroba	5	100.0	0	0.0
	Lesão	5	100.0	0	0.0
24h	Controle	5	100.0	0	0.0
	TFBM	5	100.0	0	0.0
	Andiroba	5	100.0	0	0.0
	TFBM e andiroba	5	100.0	0	0.0
	Lesão	5	100.0	0	0.0
48h	Controle	5	100.0	0	0.0
	TFBM	5	100.0	0	0.0
	Andiroba	5	100.0	0	0.0
	TFBM	5	100.0	0	0.0
	Lesão	5	100.0	0	0.0

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

Quanto a presença ou ausência de necrose observa-se que os grupos Lesão nas 24h e 48h apresentaram em 100% da amostra a necrose, sendo 60% do grupo Andiroba nas 48h; e 20% da amostra com necrose no grupo FTBM e andiroba nas 6 h e 24h (Tabela13).

Tabela 13 – Avaliação quanto a presença ou ausência de necrose nas lâminas da histologia do músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Presença	%	Ausencia	%
6h	Controle	0	0.0	5	100.0
	TFBM	0	0.0	5	100.0
	Andiroba	0	0.0	5	100.0
	TFBM e andiroba	1	20.0	4	80.0
	Lesão	0	0.0	5	0.0
24h	Controle	0	0.0	5	100.0
	TFBM	0	0.0	5	100.0
	Andiroba	0	0.0	5	100.0
	TFBM e andiroba	1	20.0	4	80.0
	Lesão	5	100.0	0	0.0
48h	Controle	0	0.0	5	100.0
	TFBM	0	0.0	5	100.0
	Andiroba	3	60.0	2	40.0
	TFBM e andiroba	0	0.0	5	100.0
	Lesão	5	100.0	0	0.0

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

Quanto a presença ou ausência de infiltrado celular (neutrófilos) observou-se em 20% da amostra do grupo andiroba nas 6h e 24h; e em 20% da amostra no grupo lesão nas 24h (Tabela 14).

Tabela 14 - Avaliação quanto a presença ou ausência de infiltrado celular nas lâminas da histologia do músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Presença	%	Ausencia	%
6h	Controle	0	0.0	5	100.0
	TFBM	0	0.0	5	100.0
	Andiroba	1	20.0	4	80.0
	TFBM e andiroba	0	0.0	5	100.0
	Lesão	0	0.0	5	100.0
24h	Controle	0	0.0	5	100.0
	TFBM	0	0.0	5	100.0
	Andiroba	1	20.0	4	80.0
	TFBM e andiroba	0	0.0	5	100.0
	Lesão	1	20.0	4	80.0
48h	Controle	0	0.0	5	100.0
	TFBM	0	0.0	5	100.0
	Andiroba	0	0.0	5	100.0
	TFBM e andiroba	0	0.0	5	100.0
	Lesão	0	0.0	5	100.0

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

3.1.4 Discussão

As lesões musculares esqueléticas são conseqüências comuns das atividades esportivas e de trabalho. Dependendo da gravidade da lesão, eles podem afetar a função muscular, levando à atrofia, contratura, dor e aumento da probabilidade de reincidência de lesão (40,67,68,69).

Após uma lesão, o processo de reparo muscular se inicia e se divide em fases interdependentes: degeneração e inflamação, regeneração, fibrose / cicatrização e remodelação (69). Durante a fase aguda, ocorre a locação de ERO, que são produtos do metabolismo oxidativo mitocondrial de células inflamatórias, endoteliais e musculares (70).

A fase inflamatória do processo de lesão muscular é acompanhada por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) e uma redução na atividade de enzimas antioxidantes de defesa (71). Esse desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, pode gerar estresse

oxidativo e nitrativo (72,73). Esses produtos gênicos incluem citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, quimiocinas e moléculas de adesão. A produção de ERO em níveis adequados em combinação com fatores de crescimento e citocinese é importante para o processo de reparo muscular devido à direção das células precursoras miogênicas (células satélites) para o local da lesão (74).

A produção excessiva desses mediadores pode ser prejudicial para a reparação muscular, pois intensifica a inflamação e pode inibir a diferenciação e a fusão dos mioblastos, prejudicando a regeneração do tecido muscular (75,76). Os altos níveis de ERO durante o período de tempo na área lesada podem causar dano oxidativo e interfere negativamente na diferenciação de células musculares (36). As ERO durante o processo de reparo muscular dependem da capacidade das enzimas antioxidantes celulares, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), para controlar os seus efeitos nocivos (74). Estas enzimas permitem um estado de equilíbrio entre os níveis de ERO produzidos durante o metabolismo e eliminados pelo sistema antioxidante (77).

Neste estudo foram analisados 5 grupos experimentais sendo: grupo controle, grupo andiroba, grupo TFBM, grupo TFBM e andiroba e grupo lesão, sendo a FTBM na dose de total de 1J ($5.07\text{J}/\text{cm}^2$) e o óleo da Andiroba em 50%; onde evidenciou-se que na mensuração da peroxidação lipídica pelo método TBARS analisados do músculo tibial anterior de ratos após lesão induzida do tipo contusão que nos grupos de TFBM e andiroba nas 6h e 24h obteve redução dos níveis da peroxidação lipídica quando comparados com os demais grupos, não sendo evidente nas 48h. Quando comparados os grupos de tratamento entre os seus tempos de observação (6h,24h e 48h) evidenciou-se que o grupo TFBM e andiroba nas 24h apresentou menor peroxidação lipídica. O grupo Controle quando comparado com o grupo lesão evidenciou-se também menor peroxidação lipídica. Quanto a nível sistêmico, neste estudo quando mensurada a peroxidação lipídica a nível de sangue, obteve-se redução dos níveis da mesma no grupo lesão as 24h.

A TFBM demonstrou ser eficaz na redução da resposta inflamatória, para promover a reparação tecidual, atenuar a dor e reduzir a fadiga muscular em diversos estudos tanto em modelos animais como em ensaios clínicos (78, 79, 80).

A TFBM produz um aumento de ERO em células normais, porem quando como um tratamento para lesão de tecidos ou danos musculares é capaz de reduzir os marcadores de estresse oxidativo (45, 81,82,83).

Em particular, a questão se o Laser de baixa potência (LLLT) aumenta ou diminui as espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo permanece sem resposta, já que há relatos apoiando ambos os lados da questão (80, 84).

Rizzi et al. (85) demonstraram que o TFBM foi capaz de bloquear os efeitos de espécies reativas de oxigênio (ERO) e reduzir a resposta inflamatória induzida por trauma. Liu et al. (86) observaram que a dose de TFBM de 8,4J (43J / cm²) apresentou melhores resultados em relação ao dano muscular e ao estresse oxidativo, 24 e 48 horas, após a indução de lesão muscular.

No estudo de Ribeiro et al (87) a peroxidação lipídica aumentou na lesão, 780 + lesão, 660 + lesão +660 e 780 + lesão +780 grupos em comparação com o grupo controle e diminuiu no grupo 660 + lesão em comparação ao grupo lesão após um dia. Além disso, houve um aumento na peroxidação lipídica no grupo de lesão em comparação ao grupo controle e uma diminuição na peroxidação lipídica em todos os grupos de irradiação em comparação ao grupo de lesão após sete dias.

Yomaza et al. (88) utilizaram um modelo experimental de trauma muscular e observaram que a LLLT (633nm, 4mW) durante sete dias consecutivos com doses de 4,8 e 9,6J por dia aumentou a atividade mitocondrial em fibras musculares, ativou fibroblastos e macrófagos e estimulou a angiogênese. Eles concluíram que, com base nisso, a LLLT aumenta e estimula a reparação do músculo esquelético

Silveira et al (89) causaram uma lesão muscular traumática por um único impacto contuso no músculo gastrocnêmio de rato. TFBM (850 nm, 3 ou 5 J / cm²) foi iniciado 2, 12 e 24 h após trauma muscular e repetido por cinco dias. A locomoção e a função muscular foram melhoradas pelo TFBM. TBARS, proteínas carbonilas, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, foram aumentados após lesão muscular, estes aumentos foram prevenidos pelo TFBM.

Importante notar que os diferentes estudos [39, 40, 68, 90, 91], utilizando outros modelos experimentais, mostram que o TFBM é eficaz independentemente do modelo de lesão muscular e do tempo experimental envolvido.

Até o momento não evidenciou-se na literatura estudos com a TFBM, óleo de andiroba ou outras plantas medicinais em lesão induzida em animais. O óleo da andiroba que é composto por ácido mirístico (TCM), ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico. Além disso, apresenta Vitamina A e E, além de lecitina de soja. Apresenta ação antiinflamatória com extensa indicação em patologias de pele. O

ácido Linoléico é importante para o transporte e metabolismo de gorduras, assim como, na manutenção da função e integridade das membranas (55).

Óleos de origem vegetal, tais como ácido oleico, linoleico e linolênico, são muito utilizados em ferimentos para auxiliar a cicatrização no Brasil (56). Os ácidos graxos apresentam 3 características: são componentes estruturais das membranas biológicas, mensageiros intracelulares e geram adenosina trifosfato (ATP). Os ácidos graxos interferem no processo inflamatório, sendo que a maioria destes eventos ocorre via ácido araquidônico como prostaglandinas, leucotrieno, tromboxanos e lipoxinas (57).

Neste estudo evidenciou-se que a associação da TFBM e o óleo de andiroba reduziram os níveis de peroxidação lipídica nas 6h e 24h, comparando o grupo Controle com o grupo TFBM os níveis de peroxidação lipídica foram próximos, bem como no grupo andiroba nas 6h e 24h, porém no grupo andiroba as 48h e no grupo TFBM e andiroba as 48h, evidenciou-se um aumento da peroxidação lipídica. Segundo Brito et al (58) apesar da confirmação dos efeitos antiinflamatórios, a aplicação do mesmo gerou prejuízo no processo de cicatrização com retardo da contração e epitelização das feridas, este fator pode ser sugestivo do aumento da peroxidação lipídica, o que poderia ser observado aumentando em novos estudos o tempo de observação dos grupos. Pennaforte (59) avaliou a atividade anti-inflamatória e analgésica de óleos de duas plantas amazônicas (copaíba e andiroba) e em seu estudo apresentou que o óleo de Andiroba possui atividade analgésica, antialérgica e anti-histamínica inibindo a formação de edema local.

Quanto a presença de substâncias antioxidantes em relação a mensuração de Catalase, Glutathione peroxidase, Superóxido dismutase. Neste estudo não evidenciou-se diferença estatisticamente significativa nos grupos analisados e nem nos tempos de observação de cada grupo em relação a catalase. Quanto a Glutathione peroxidase evidenciou-se que no grupo TFBM apresentou diferença estatisticamente nas 48h em relação aos demais grupos no mesmo tempo de observação; e o Grupo Lesão nas 6h; e quando analisados o grupo TFBM e andiroba nos tempos de observação e o grupo controle observa-se que o grupo controle apresentou diferença estatisticamente. Já em relação a superóxido dismutase evidenciou-se que no grupo lesão apresentou diferença estatisticamente nos 3 tempos de observação; e quando analisados o grupo TFBM e andiroba e TFBM nos tempos de observação e o grupo controle observa-se que o grupo controle apresentou diferença estatisticamente, em

relação ao grupo Lesão observa-se que nas 06h foi estatisticamente diferente em relação aos outros tempos e o grupo controle.

Uma característica peculiar da terapia fotobiomoduladora é a capacidade de melhorar e acelerar o processo de cicatrização, reduzir a dor e o edema (92,93)

Tomazoni et al (39), Rennó et al. (68), De Almeida et al.(90) e Rodrigues et al. (91) observaram que o TFBM foi eficaz na redução da inflamação, melhorando a organização das fibras musculares e reduzindo a área de necrose celular e hemorragia no local da lesão.

Neste estudo evidenciou-se a presença de edema em todos os grupos experimentais. Quanto a presença de necrose evidenciou-se no grupo Lesão nos tempos de 24h e 48h, e no grupo andiroba as 48h, este fato pode ser sugerido pelo aumento da inflamação nas fases iniciais feita pela andiroba como sugerido por Brito et al (58). E relação a presença de infiltrado observa-se poucos casos, sendo 1 animal no grupo andiroba 6h e 24h e 1 animal no grupo lesão as 24h.

3.1.5 Conclusão

Neste estudo com a terapia de fotobiomodulação (1J) e o óleo de andiroba (50%de concentração), evidenciou-se que ocorreu redução dos níveis de peroxidação lipídica nos grupos de TFBM e andiroba nas 6h e 24h, aumento da glutathione peroxidase nos grupo grupo TFBM (48h), quanto superóxido dismutase a TFBM e andiroba e TFBM nos tempos de observação e o grupo controle observa-se que o grupo controle apresentou diferença estatisticamente, em relação ao grupo Lesão observa-se que nas 06h foi estatisticamente diferente em relação aos outros tempos e o grupo controle. Apresentou também em relação a observação histológica: edema discreto nos grupos TFBM e TFBM e andiroba, necrose no grupo lesão e baixo número de infiltrado celular. Esses dados sugerem que a associação dos efeitos anti-inflamatórios da TFBM e do óleo da andiroba foram positivos em alguns dados, sendo necessários novos estudos com novas janelas terapêuticas do TFBM para observar se a associação é positiva. Este fato pode favorecer a comunidade ribeirinha que já utiliza o óleo de andiroba nas lesões do dia a dia, bem como elucidar a comunidade científica de uma nova possibilidade de ação terapêutica, visto que os efeitos da TFBM não são questionáveis quanto a capacidade anti-inflamatória, porém em relação a associação com plantas medicinais é uma nova proposta terapêutica, com baixos custos e baixos efeitos adversos.

3.2 ESTUDO II - Os efeitos da terapia por fotobiomodulação e da andiroba (*carapa guianensis*) na lesão muscular induzida por contusão no músculo tibial de rato: Parte 2- Citocinas

3.2.1 Introdução

A terapia por fotobiomodulação (TFBM) para músculos visa beneficiar o desempenho atlético e o treinamento, reduzir a dor muscular de início tardio, bem como melhorar os sinais de dano muscular (creatina quinase) após exercício intenso ou prolongado. Além disso, a TFBM também pode ser usado para tratar lesões musculares francas causadas por tensões musculares ou traumas (47).

O processo de regeneração muscular após a lesão muscular é complexo e envolve sinalização molecular e celular (94). A regeneração muscular envolve três fases: reparação da destruição e remodelação (95). Degeneração e inflamação ocorrem durante os primeiros dias após a lesão (96). A resposta inflamatória é importante para uma regeneração osteomuscular positiva, caracterizada pela liberação de neutrófilos, macrófagos e citocinas. Dos mediadores inflamatórios liberados, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) desempenha um papel-chave na liberação de uma variedade de citocinas (por exemplo, interleucina [IL] -1 β , IL-6 e IL-10), influenciando assim as outras fases da regeneração muscular (97,98,99).

Avanços na compreensão dos mecanismos de ação da TFBM em nível molecular e celular, forneceram uma justificativa científica para seu uso em múltiplas doenças. Embora as vias de sinalização celular exatas responsáveis por essa ação antiinflamatória ainda não sejam completamente compreendidas, está ficando claro que tanto os mecanismos locais quanto os sistêmicos estão operando. A redução local do edema e reduções nos marcadores de estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias estão bem estabelecidas.

A andiroba (*Carapa guianensis*Aublet) foi descrita pela primeira vez em 1775 na Guiana Francesa pelo botânico francês Jean-Baptiste Christopher Fuscé Aublet. O óleo de andiroba é obtido das sementes que caem das árvores e possui alta viscosidade, é rico em estearina e outros ácidos graxos insaturados, principalmente palmítico, esteárico, oléico, linoléico e behênico. Além disso, possui substâncias como triterpenos que tem ação anti-inflamatória (53).

A andiroba é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada na região amazônica brasileira. Desta planta é extraído o óleo de andiroba, que é composto por ácido mirístico (TCM), ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico. Além disso, apresenta Vitamina A e E, além de lecitina de soja. Apresenta ação antiinflamatória com extensa indicação em patologias de pele. O ácido Linoléico é importante para o transporte e metabolismo de gorduras, assim como, na manutenção da função e integridade das membranas (55).

Diante do exposto o objetivo deste estudo é mensurar os níveis do fator de necrose tumoral e da interleucina 6 após trauma induzido em ratos por contusão tratados com a TFBM, o óleo de andiroba tópico; e com a TFBM e o óleo de andiroba associados.

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Aspectos éticos e modelo experimental

Todos os animais foram cuidados segundo a legislação nacional para Procedimentos para o Uso Científico de Animais em vigor (Lei federal 11.794), o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade do Estado do Pará (UEPA) por meio do protocolo nº 24/2016.

3.2.2.2 Animais

Foram utilizados 65 ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar*, adultos, com idade média de 80 dias ou 10 semanas (adulto em fase reprodutiva) e pesando entre 280 a 350g; provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC) e transferidos ao biotério Luiz Carlos de Lima Silveira da Universidade do Estado do Pará (UEPA), onde foram alocados em gaiolas de acrílico apropriadas com fundo contendo maravalha, mantidos em ambiente de temperatura entre 22 e 25°C, recebendo água e ração *ad libitum* durante o período do experimento e ciclo de luz noite/dia de 12 horas (h).

3.2.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos por grupos aleatórios. Em 5 grupos experimentais com análises temporais compreendendo 06, 12 e 48hs em cada grupo, com 5 animais em cada análise temporal, totalizando 65 animais.

Os grupos experimentais foram utilizados de acordo com o protocolo de tratamento descrito abaixo:

1. Grupo Controle (n=5): grupo de animais que não foram submetidos a qualquer tipo de procedimento.
2. Grupo Lesão (n=15): animais foram submetidos apenas ao protocolo de lesão.
3. Grupo de tratamento com terapia por fotobiomodulação (n= 15): grupo de animais que foram submetidos à lesão e tratados com a fotobiomodulação.
4. Grupo de tratamento com óleo de andiroba (n=15): grupo de animais que foram submetidos à lesão e tratados com o óleo de andiroba.
5. Grupo de tratamento por terapia por fotobiomodulação e óleo de andiroba (n=15): grupo de animais que foram submetidos à lesão e tratados com a associação da terapia por fotobiomodulação e óleo de andiroba.

3.2.2.4 Indução da lesão muscular por contusão

Os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal (i.p) com uma associação de Ketamina e Xilazina (90 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente). Posteriormente, foram tricotomizados e foram randomizados em grupos e submetidos ao protocolo de lesão por contusão, onde os animais foram posicionados em decúbito dorsal com leve rotação interna da articulação do quadril e flexão plantar do tornozelo, para que a pata direita se posicionasse em extensão, apoiada na parte inferior da prensa lesionadora. Em seguida, um único trauma foi realizado utilizando um mini guilhotina, que compreende um bloco de peso de 200g com uma ponta chanfrada 2 mm de largura, deixada cair a partir de 20cm, guiadas por meio de suportes realizando a lesão em um único golpe no músculo tibial anterior.

3.2.2.5 Tratamentos

3.2.2.5.1 Terapia por fotobiomodulação (TFBM)

Os animais após uma hora da contusão foram imobilizados manualmente para receber uma única irradiação da terapia por fotobiomodulação (TFBM) em contato com a pele na região do ventre muscular do musculo tibial anterior, sendo 3 subgrupos temporais de 6h, 24h e 48h, totalizando 15 animais. Posteriormente a cada fechamento do tempo de cada grupo os animais foram anestesiados para punção do

sangue no ventrículo esquerdo, seguida de uma dose letal para eutanásia e retirada do músculo.

O equipamento foi do modelo MR4, com o cluster SE25, ambos fabricados pela empresa Multi Radiance Medical, fabricado em Solon - OH, USA, com os seguintes parâmetros (Tabela 15).

Tabela 15. Parâmetros da Terapia de Fotobiomodulação (TFBM)

Número de lasers	1 Super - pulsado de infravermelho
Comprimento de onda (nm)	905 (± 1)
Frequência (Hz)	250
Pico de potência (W)	25
Average mean optical output (mW)	0.625
Densidade de potência (mW / cm ²)	1.42
Densidade de energia (J/cm ²)	0.011
Dose (J)	0.005
Tamanho do ponto de laser (cm ²)	0.44
Número de LEDs vermelhos	4 vermelhos
Comprimento de onda de LEDs vermelhos (nm)	640 (± 10)
Frequencia (Hz)	2
Comprimento de onda de LEDs vermelhos (mW) – cada	15
Densidade de potência (mW/cm ²) – cada	16.66
Densidade de energia (J/cm ²) – cada	0.133
Dose (J) – cada	0.12
Tamanho do ponto de LED vermelho (cm ²) – cada	0.9
Número de LED infravermelhos	4 Infravermelhos

Comprimento de onda de LED infravermelhos (nm)	875 (± 10)
Frequência (Hz)	16
Saída óptica média (mW) – each	17.5
Densidade de potência (mW/cm ²) – each	19.44
Densidade de energia (J/cm ²) – each	0.155
Dose (J) - each	0.14
Tamanho de ponto de LED (cm ²) – cada	0.9
Campo Magnético (mT)	35
Tempo de irradiação por site (s)	8
Dose total (J)	1.0
Dose total aplicada em grupo muscular (J)	1.0
Abertura do dispositivo (cm ²)	0.197
Densidade de potência do dispositivo (mW/cm ²)	663.07
Densidade de energia do dispositivo (J/cm ²)	5.07
Modo de aplicação	Cluster mantido estacionário em contacto com a pele com um ângulo de 90 graus e uma ligeira pressão

Fonte: Multi Radiance Medical - OH, USA

3.2.2.5.2 Andiroba

No grupo Andiroba, após uma hora da lesão por contusão os animais foram imobilizados manualmente para receber uma única aplicação tópica do óleo de andiroba em contacto com a pele na região do ventre muscular, sendo 3 subgrupos temporais de 6h, 24h e 48h, totalizando 15 animais. Posteriormente a cada fechamento do tempo de cada grupo os animais foram anestesiados para punção do

sangue no ventrículo esquerdo, seguida de uma dose letal para eutanásia e retirada do músculo

A andiroba foi extraída e disponibilizada pela Empresa FAGRON e manipulada na farmácia da empresa para obter concentração de 50%.

Caracterização do óleo de Andiroba

A caracterização do óleo da Andiroba utilizado neste estudo foi realizada pelo Farmacêutico MsC Luann W.P de Sena (CRF/PA: 4082), Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Pará, colaborador no grupo do laboratório de Morfologia da Universidade do Estado do Pará (quadro 3 e 4)

Quadro 3- Determinação de Ácidos graxos

Ácidos Graxos	Átomos de carbono	Composição percentual
Mirístico	14:00	0,33
Palmítico	16:00	28,03
Esteárico	18:00	8.69
Oléico	18:10	49,08
Linoleico	18:20	11,03
Linolênico	18:30	1,35
Araquídínico	20:00	0,22
Beênico	22:00	0,34

Fonte: Pesq***
uisa de Campo, 2018.

Quadro 4 - Dados Físico-Químicos do óleo de Andiroba

Índices	Unidades	Valores de Referência
Índice de Acidez	mg KOH/g	1,4 +/- 0,02
Índice de peróxido	Meq.peróx/100g amostra	5,76 +/- 0,004
Índice de saponificação	mg KOH/g	198,4 +/- 1,02
Índice de Iodo	gI ² /100g	69 +/- 0.09
Densidade	g/mL a 50°C	0,98 +/- 0,001
Índice de refração	50°C	1,468 +/- 0,008

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

3.2.2.5.3 Andiroba e Terapia por fotobiomodulação

Os animais após uma hora da lesão foram imobilizados manualmente para receber uma única irradiação TFBM em contato com a pele na região do ventre muscular, com os mesmos parâmetros do grupo TFBM e posteriormente a aplicação tópica do óleo de andiroba, semelhante ao grupo que somente recebeu a aplicação tópica do óleo, sendo 3 subgrupos temporais de 6h, 24h e 48h, totalizando 15 animais. Posteriormente a cada fechamento do tempo de cada grupo os animais foram anestesiados para punção do sangue no ventrículo esquerdo, seguida de uma dose letal para eutanásia e retirada do músculo.

3.2.2.6 Retirada do músculo, eutanásia e armazenamento

Após o período de tratamento, todos os animais, receberam uma dose letal de anestésico, sendo confirmada sua morte, seguiu realizando retirada do músculo tibial (TA), onde durante a dissecação, os músculos foram periodicamente gotejados com solução salina (NaCl 0,9%), para evitar ressecamento tecidual. Em seguida, a área correspondente a lesão foi dividida ao meio, porção proximal e distal, com um corte transversal (63). A porção proximal foi utilizada para análise morfológica e a porção distal ainda foi dividida por um corte horizontal, sendo as partes armazenadas, cada uma, em eppendorf para Ensaio Imunológico Enzimático (TNF-alfa ILF-6). Em seguida, os músculos foram congelados e armazenados em freezer a -80°C .

3.2.2.7 Homogeneização da amostra

A amostra do músculo tibial anterior coletado foi pesada em uma balança de precisão, sendo seu peso ideal esteja entre 0,5g a 0,098g, onde foi colocada a mesma quantidade de solução salina e submetida a homogeneização por meio de um homogeneizador automático durante 20 segundos. Posteriormente, foi realizada a centrifugação com parâmetros de 1200 rpm durante 3 minutos, após a centrifugação retirou-se à parte sobrenadante, a qual foi transferida para dois eppendorf, e sendo armazenados em um Freezer -80° até o dia da análise (64).

3.2.2.8 Avaliação dos níveis de citocinas por meio do método de ELISA

Após a eutanásia o músculo tibial foi coletado e inserido no nitrogênio líquido e posteriormente armazenado do freezer -80°C até o dia preparação e análise das amostras. As dosagens das citocinas TNF- α e IL-6 nas amostras do tibial anterior

foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (*Cloud-Clone Corp - USA*).

Para o ensaio, foi utilizado placas de 96 poços que foram sensibilizadas com 100 µl de anticorpo monoclonal (anticorpo de captura) na diluição de 1: 800 para o TNF-α e de 1: 500 para a IL6 em solução de tampão de revestimento (Cat IS049) para placas que foram incubadas *overnight* em temperatura de -4°C por 18 horas. Após este período, os poços foram aspirados com pipeta multicanal e lavados com 350µL de solução de trabalho de *Wash Buffer* (Cat IS049) que ficou descansando por um período de um a dois minutos. Em seguida, foi retirada a solução de lavagem e as placas foram viradas e colocadas em papel absorvente para remover o restante da solução. Posteriormente, foi adicionado 200µL de solução de trabalho de tampão de bloqueio (Cat IS049) em cada poço e incubada a 37 °C por 1 hora e meia. Após esse tempo, os poços foram lavados novamente como descrito no passo anterior, agora as placas estão prontas para detecção das amostras.

Foram adicionados 100µL em duplicata de diferentes concentrações de padrões na concentração inicial de 1000 pg /ml para a TNF-α e 2000 pg/ ml para a IL-6. Em seguida, foi realizada diluição em série do padrão com solução de trabalho do reagente diluente 1 (Cat IS049) para obter uma curva padrão. Nos restantes dos poços foram adicionadas as amostras, selado com selador de placas e incubados por 1 hora a 37°C.

Ao término do tempo as placas foram aspiradas e lavadas uma vez como descrito anteriormente. Em seguida, foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção (Anticorpo anti-rato Biotinilado) previamente diluídos na solução de reagente diluente 2 (Cat IS049) na proporção de (1: 1000 para a TNF-α e 1:500 para a IL6). A placa foi coberta com selador de placas (Cat IS049) e incubada por 1 hora. Após esse período, os poços foram aspirados e lavados 3 vezes com a solução de lavagem. Ao final desse processo, foram adicionados 100 µL de Streptoavidina-HRP diluída previamente em solução de reagente diluente 3 (Cat IS049) na proporção (1:100) tanto para TNF-α quanto para a IL-6. As placas foram cobertas com selador de placas e incubado por 30 minutos em temperatura a 37°C. Ao final desse período, as placas foram lavadas durante 5 vezes com a solução de lavagem como nos passos anteriores. Ao término do processo, foram adicionados 90µL de substrato Tetrametilbenzidina – TMB - (Cat IS049) a cada poço e incubado por 15 minutos a 37°C protegido da luz. A reação foi interrompida quando adicionados 50µL de solução

de paragem (1 mol / l de H₂SO₄) a cada poço sob agitação lenta. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Espectrofotômetro Ultraspec) utilizando filtro de 450 nm.

3.2.2.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm EPM e submetidos ao teste Shapiro- Wilk, para verificação de normalidade. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do Programa Graph Pad Prisma 5, utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), para as comparações entres os grupos, seguidos da aplicação de pós- teste de Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância utilizado foi de 5%.

3.2.3 Resultados

A seguir apresenta -se os dados referentes as análises dos níveis da Interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) do músculo tibial anterior de ratos submetidos a lesão induzida do tipo contusão que receberam tratamento por meio da TFBM, do óleo de andiroba tópico, TFBM e óleo de andiroba, sendo observados também em relação ao grupo controle, onde os animais não tiveram a lesão e nem tratamento; e o grupo lesão que foram submetidos ao dano muscular.

Em relação aos níveis de IL6 obteve- se diferença estatisticamente significativa no grupo terapia por fotobiomodulação e andiroba no tempo de 48h quando comparados aos demais grupos, apresentando também diferença estatística nos grupos lesão nas 6h e 24h (Tabela 16). Quando a análise nos grupos foi realizada nos tempos de observação e o grupo controle evidencia-se diferença estatisticamente significativa no grupo terapia por fotobiomodulação e andiroba e no grupo lesão nas 48h (Tabela 17).

Tabela 16 - Mensuração dos níveis de IL-6 no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
6h	Controle	0.97	0.3	0.67	1.47	0.0039*
	TFBM	1.21	0.33	0.93	1.77	
	Andiroba	1.26	0.33	0.75	1.56	
	TFBM e andiroba	1.18	0.18	0.94	1.44	
	Lesão	0.47	0.37	0.04	0.89	
24h	Controle	0.97	0.3	0.67	1.47	0.0099*
	TFBM	0.78	0.12	0.61	0.91	
	Andiroba	0.95	0.14	0.75	1.13	
	TFBM e andiroba	0.82	0.39	0.46	1.34	
	Lesão	0.32	0.34	-0.13	0.8	
48h	Controle	0.97	0.3	0.67	1.47	< 0.0001*
	TFBM	0.97	0.35	0.56	1.5	
	Andiroba	1.09	0.3	0.6	1.38	
	TFBM e andiroba	-0.01	0.34	-0.58	0.3	
	Lesão	0.12	0.45	-0.65	0.45	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Tabela 17- Mensuração dos níveis de IL-6 no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
TFBM	Controle	0.97	0.3	0.67	1.47	0.1859
	6h	1.21	0.33	0.93	1.77	
	24h	0.78	0.12	0.61	0.91	
	48h	0.97	0.35	0.56	1.5	
Andiroba	Controle	0.97	0.3	0.67	1.47	0.3136
	6h	1.26	0.33	0.75	1.56	
	24h	0.95	0.14	0.75	1.13	
	48h	1.09	0.3	0.6	1.38	
TFBM e andiroba	Controle	0.97	0.3	0.67	1.47	0.0001*
	6h	1.18	0.18	0.94	1.44	
	24h	0.82	0.39	0.46	1.34	
	48h	-0.01	0.34	-0.58	0.3	
Lesão	Controle	0.97	0.3	0.67	1.47	0.0142*
	6h	0.47	0.37	0.04	0.89	
	24h	0.32	0.34	-0.13	0.8	
	48h	0.12	0.45	-0.65	0.45	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Em relação ao TNF- α observou-se que o grupo lesão apresentou diferença estatisticamente significativa nas 48h em relação aos grupos tratados e grupo controle, não sendo identificado diferença estatisticamente significativa nos demais tempos (6h e 24h) (Tabela 18). Quando comparados os grupos de tratamento nos 3 tempos de observação (6h, 24h e 48h) com o grupo controle evidenciou-se diferença estatisticamente significativa nos grupos Andiroba(48h), andiroba e TFBM (48h) e no grupo lesão (48h) (Tabela 19).

Tabela 18 - Mensuração dos níveis de TNF- α no músculo tibial anterior de ratos em 3 espaços temporais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
6h	Controle	0.87	0.2	0.57	1.12	0.2033
	TFBM	0.51	0.24	0.19	0.8	
	Andiroba	1.16	0.34	0.81	1.55	
	*TFBM e andiroba	0.59	0.08	0.48	0.7	
	Lesão	0.68	0.89	-0.07	2.16	
24h	Controle	0.87	0.2	0.57	1.12	0.1284
	TFBM	0.51	0.49	0.19	1.38	
	Andiroba	0.65	0.26	0.42	1.08	
	*TFBM e andiroba	0.72	0.29	0.21	0.9	
	Lesão	0.26	0.46	-0.54	0.62	
48h	Controle	0.87	0.2	0.57	1.12	0.0004*
	TFBM	0.68	0.47	0.2	1.42	
	Andiroba	0.48	0.35	-0.1	0.8	
	*TFBM e andiroba	0.24	0.28	-0.2	0.57	
	Lesão	-0.28	0.36	-0.83	0.15	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

Tabela 19- Mensuração dos níveis de TNF- α no músculo tibial anterior de ratos entre os grupos experimentais submetidos a lesão induzida do tipo contusão e após aplicado a TFBM, óleo de andiroba e TFBM mais óleo de andiroba (N=65)

Intervalo	Método	Média	DP	Mínimo	Máximo	P-valor
TFBM	Control	0.87	0.2	0.57	1.12	0.4071
	6h	0.51	0.24	0.19	0.8	
	24h	0.51	0.49	0.19	1.38	
	48h	0.68	0.47	0.2	1.42	
Andiroba	Controle	0.87	0.2	0.57	1.12	0.0121*
	6h	1.16	0.34	0.81	1.55	
	24h	0.65	0.26	0.42	1.08	
	48h	0.48	0.35	-0.1	0.8	
TFBM e andiroba	Controle	0.87	0.2	0.57	1.12	0.0036*
	6h	0.59	0.08	0.48	0.7	
	24h	0.72	0.29	0.21	0.9	
	48h	0.24	0.28	-0.2	0.57	
Lesão	Controle	0.87	0.2	0.57	1.12	0.0192*
	6h	0.68	0.89	-0.07	2.16	
	24h	0.26	0.46	-0.54	0.62	
	48h	-0.28	0.36	-0.83	0.15	

Fonte: Pesquisa de Campo, 2018.

*Teste anova ($p < 0,05$)

3.2.4 Discussão

Entre as terapias atuais, a terapia de fotobiomodulação é conhecida por ser eficaz no tratamento de vários distúrbios musculoesqueléticos, como osteoartrite, tendinopatias, lombalgia, cervicalgia e fadiga muscular (41, 60, 79, 90, 100-112). Estudos recentes demonstraram que o TFBM reduz a liberação de marcadores inflamatórios (41, 90, 113) e acelera o processo de regeneração muscular (40, 114). No entanto, pouquíssimos estudos se concentraram nos efeitos da TFBM no processo inflamatório causado pela contusão muscular, e há um conhecimento limitado sobre a otimização dos parâmetros da TFBM e a posologia mais eficaz (38). Neste estudo foram avaliados e comparados os efeitos da TFBM (905nm, 1J) e do óleo da andiroba tópica em diferentes tempos de observação (6h, 24h e 48h) analisando o TNF e IL6 durante um processo inflamatório agudo desencadeado por um modelo controlado de lesão musculoesquelética induzida por contusão em ratos.

A IL-1 e o TNF são conhecidos como citocinas pró-inflamatórias, por induzirem a expressão de outras citocinas, como por exemplo a IL-2, e de mediadores que

promovem a inflamação. Entretanto, sua principal importância na imunidade reside em sua capacidade de intensificar a ativação dos linfócitos T auxiliares por células apresentadoras de antígeno. Adicionalmente, promovem a diferenciação das células B, ativam neutrófilos, macrófagos e estimulam a hematopoiese (40). São importantes indutores da resposta de fase aguda e estimulam a secreção do fator de liberação da corticotrofina, o qual ativa a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise, induzindo por sua vez, a produção de glicocorticóides pelas glândulas suprarrenais (93).

A IL-6 proporciona efeitos sinérgicos com a IL-1 e o TNF, porém não induz a produção de qualquer outra citocina e possui efeito direto relativamente pequeno sobre as células imunes em concentrações fisiológicas. Alguns autores sugerem que sua principal função imunológica consiste em potencializar os efeitos de outras citocinas(115).

A citocina pró-inflamatória IL-6 é conhecida por desempenhar um papel importante na proliferação, diferenciação e fusão de células musculares (116-118). Além disso, a IL-6 está diretamente envolvida na expressão de fatores de regulação miogênica, responsáveis pela regeneração muscular (94).

A gravidade desse processo depende da intensidade e duração da resposta inflamatória (71). Assim, durante a reabilitação da lesão muscular, abordagens terapêuticas que visam evitar o dano oxidativo e diminuir o processo inflamatório podem ser úteis para promover o reparo e restabelecer a homeostase (40)

No estudo de Almeida et al (41), com a terapia Laser de baixa potência (TLBP) de 904 nm com dose de 1 J diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias na fase inflamatória aguda após a contusão muscular. Além disso, a TLBP foi melhor que a aplicação tópica de diclofenaco e aplicação local da crioterapia.

Tem sido relatado que a TFBM auxilia no processo de regeneração tecidual (40, 114) e reduz a liberação de marcadores inflamatórios (41, 90, 113]. Silveira et al (89) relata em seu estudo que a TFBM preveniu aumentos de IL-6 e IL-10

Tomazoni et al (38), demonstrou em seu estudo a efetividade da TFBM na modulação do processo inflamatório. A redução mediada pela TFBM na liberação de marcadores inflamatórios, sendo esta independente da dosagem e do tempo experimental avaliados. Segundo os autores, o TFBM alivia a resposta inflamatória aguda em baixas, intermediárias e altas doses, sendo a dose mais efetiva na modulação do processo inflamatório associado à contusão muscular no referido

estudo a dose 3-J (107,1 J / cm²). A redução mediada pela TFBM na resposta inflamatória pode ser atribuída a uma diminuição inicial na expressão de TNF- α , seguida pela inibição de citocinas envolvidas na inflamação da fase aguda (80, 119,120). Nos resultados de Tomazoni et al (38) indicam que a TFBM reduziu a expressão de IL-6 e possivelmente acelerou o processo de regeneração tecidual após a contusão muscular.

A Andiroba, conhecida também como andirova, carapa, purga- de-santo- Inácio e outros nomes, pertence a família das meliáceas. O óleo da andiroba é extraído por prensagem de suas sementes. As principais substâncias ativas relacionadas com a ação anti-inflamatória, são os limonóides e triterpenos (121). Estudos demonstram que triptenos e limonóides agem inibindo a COX-2, enzima responsável pela conversão do ácido aracdônico para as via das prostaglandinas, porém o exato mecanismo é desconhecido (122,123).

Castello Branco Neto (124) comparando o efeito cicatrizante do óleo de andiroba, com a fração diclorometano da aroeira e grupo controle, em feridas abertas na região dorsocostal de ratos concluiu que não ocorreram diferenças significantes nas densidades de colágenos jovens e de colágenos maduros entre os grupos; e o estudo imunológico das citocinas interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4) e fator de necrose tumoral (TNF) nestes grupos também não apresentaram diferenças significantes nos três tempos de análises.

Neste estudo evidenciou-se que em relação aos níveis de IL6 obteve-se diferença estatisticamente significativa no grupo terapia por fotobiomodulação e andiroba no tempo de 48h quando comparados aos demais grupos, apresentando também diferença estatística nos grupos lesão nas 6h e 24h. Quando a análise nos grupos foi realizada nos tempos de observação e o grupo controle evidencia-se diferença estatisticamente significativa no grupo terapia por fotobiomodulação e andiroba e no grupo lesão nas 48h.

Em relação ao TNF- α observou-se que o grupo lesão apresentou diferença estatisticamente significativa nas 48h em relação aos grupos tratados e grupo controle, não sendo identificado diferença estatisticamente significativa nos demais tempos (6h e 24h) . Quando comparados os grupos de tratamento nos 3 tempos de observação (6h, 24h e 48h) com o grupo controle evidenciou-se diferença estatisticamente significativa nos grupos Andiroba(48h), andiroba e TFBM (48h) e no grupo lesão (48h). Os achados sugerem que a associação da TFBM e do óleo de andiroba contribuíram

para a modulação do processo inflamatório nas 48h. Novos estudos com outras doses terapêuticas do TFBM associados ao óleo de andiroba são necessários para que fiquem melhor evidenciados os efeitos associados e isolados.

3.2.5 Conclusão

Neste estudo com a terapia de fotobiomodulação (1J) e o óleo de andiroba (50%de concentração), evidenciou-se que em relação aos níveis de IL6 obteve-se diferença estatisticamente significativa no grupo terapia por fotobiomodulação e andiroba no tempo de 48h quando comparados aos demais grupos, apresentando também diferença estatística nos grupos lesão nas 6h e 24h. Em relação ao TNF- α observou-se que os grupos de tratamento nos 3 tempos de observação (6h, 24h e 48h) com o grupo controle evidenciou-se diferença estatisticamente significativa nos grupos Andiroba(48h), andiroba e TFBM (48h) e no grupo lesão (48h). Os achados sugerem que a associação da TFBM e do óleo de andiroba contribuíram para a modulação do processo inflamatório nas 48h. Novos estudos com outras doses terapêuticas do TFBM associados ao óleo de andiroba em outras concentrações são necessários para que fiquem melhor evidenciados os efeitos associados e isolados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo com a terapia de fotobiomodulação (1J) e o óleo de andiroba (50%de concentração), evidenciou-se que ocorreu redução dos níveis de peroxidação lipídica quando analisado o músculo, nos grupos de TFBM e andiroba nas 6h e 24h, aumento da glutathione peroxidase nos grupo grupo TFBM (48h), quanto superóxido dismutase a TFBM e andiroba e TFBM nos tempos de observação e o grupo controle observa-se que o grupo controle apresentou diferença estatisticamente, em relação ao grupo Lesão observa-se que nas 06h foi estatisticamente diferente em relação aos outros tempos e o grupo controle. Apresentou também em relação a observação histológica: edema discreto nos grupos TFBM e TFBM e andiroba, necrose no grupo lesão e baixo número de infiltrado celular.

Em relação aos níveis de IL6 obteve-se diferença estatisticamente significativa no grupo terapia por fotobiomodulação e andiroba no tempo de 48h quando comparados aos demais grupos, apresentando também diferença estatística nos grupos lesão nas 6h e 24h. quanto aos níveis de TNF- α observou-se que os grupos de tratamento nos 3 tempos de observação (6h, 24h e 48h) com o grupo controle

evidenciou-se diferença estatisticamente significativa nos grupos Andiroba(48h), andiroba e TFBM (48h) e no grupo lesão (48h).

Esses dados sugerem que a associação dos efeitos anti-inflamatórios da TFBM e do óleo da andiroba foram positivos em alguns dados, sendo necessários novos estudos com novas janelas terapêuticas do TFBM para observar se a associação é positiva. Este fato pode favorecer a comunidade ribeirinha que já utiliza o óleo de andiroba nas lesões do dia a dia, bem como elucidar a comunidade científica de uma nova possibilidade de ação terapêutica, visto que os efeitos da TFBM não são questionáveis quanto a capacidade anti-inflamatória, porém em relação a associação com plantas medicinais é uma nova proposta terapêutica, com baixos custos e baixos efeitos adversos.

REFERENCIAS

- 1 – Haskell W. L. et al. (2007).Physical Activity and Public Health: Updated Recommendation for Adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 39, n. 8, p. 1423–1434.
- 2 - Kirkendall D. T, Garrett W. E. (2002). Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 403 Suppl, p. S81-89.
- 3 - Maffulli N. et al.(2011). Sport injuries: a review of outcomes. *British Medical Bulletin*, v. 97, n. 1, p. 47–80.
- 4 - Mackey A.L, Mikkelsen U.R, Magnusson S.P, Kjaer M.(2012). Rehabilitation of muscle after injury – the role of anti-inflammatory drugs. *J Med Sci Sports*.p. e8- e14.
- 5- Järvinen MJ, Lehto MU.(1993) The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med (Auckland, N.Z.)*;15(2):78-89.
- 6- Järvinen T.A.H, Kääriäinen M, Järvinen M; KalimoH.(2000). Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol*. 15:155-161
- 7- Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F, Uehara K, Fu FH, Huard J.(2008). Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitor effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. *Am J Sports Med*. 36:23542362.
- 8- Falcai M.J, Monte-Raso V.V, Okubo R, Zamarioli A, Carvalho L.C, Shimano A.C.(2010). Análise biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidas à lesão muscular e tratados com laserterapia de baixa intensidade. *Rev Bras Ortop*. 45:444-448.

- 9- Shu B, Yang Z, Li X, Zang L. (2012). Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion. **Cell Biochem Biophys**. 62: 329-336.
- 10- Iwata A, Fuchioka S, Hiraoka K, Masuhara M, Kami K.(2010). Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. *Mus Ner*.41:694-701.
- 11- Martínez A.C, Alvarez-Mon M.(1999). O sistema imunológico (II): importância dos imunomoduladores na recuperação do desportista. *Rev Bras Med Esp*. ; 5:159-166.
- 12 - Kakanis M. W. et al.(2010). The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. **Exercise Immunology Review**, v. 16, p. 119–137.
- 13 - Morgado J. P. et al.(2016). Immune cell changes in response to a swimming training session during a 24-h recovery period. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquée, Nutrition Et Métabolisme*, v. 41, n. 5, p. 476–483.
- 14- Ayres MCC, Chaves MH. (2009). Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Quimica Nova*, v.32, n. 6, p.1509-1512.
- 15- [Dos Santos JL](#), [Dantas RE](#), [Lima CA](#), [de Araújo SS](#), [de Almeida EC](#), [Marçal AC](#), [Estevam Cdos S](#) (2014). Protective effect of a hydroethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* on muscular damage and oxidative stress caused by strenuous resistance training in rats. [J Int Soc Sports Nutr](#). Dec 24;11(1):58.
- 16 – Lima FO, Bezerra AS. (2012). Flavonoides e radicais livres. *Ciencias Naturais e tecnológicas, Santa Maria*, v 13, n.1, p. 111- 124.
- 17- Powers S.K, Talbert E.E, Adihetty P.J. 2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol*. 589: 2129-38.
- 18 - Syed I, Kyathanahalli C.N, Jayaram B, Govind S, Rhodes C.J, Kowluru R.A, Kowluru A. (2011). Increased phagocytelike NADPH oxidase and ROS generation in type 2 diabetic ZDF rat and human islets: role of Rac1-JNK1/2 signaling pathway in mitochondrial dysregulation in the diabetic islet. *Diabetes*. 60(11): 2843-52.
- 19 – Bianchi MLP, Antunes LMG. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de nutrição*. v.12, n.2, p.123- 130.
- 20 – Halliwell B, Gutteridge JMC. (2000) *Free radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. New York: Oxford Science Publications.
- 21 – Barreiros ALBS, David JM.(2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n.1, p. 113-123.

- 22- Cerqueira FM; Medeiros MHG, Augusto O. (2007). Antioxidante dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, v.30, n.2, p.441-449.
- 23- Valko M, Leibfritz D, Moncol JAN, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p.44-84.
- 24 - Aoi, W. et al.(2004). Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 37, n. 4, p. 480–487.
- 25 - Ascensão A. et al. (2008). Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clinical Biochemistry*, v. 41, n. 10–11, p. 841–851.
- 26 - Felismino A. S. et al. (2014) Effect of low-level laser therapy (808 nm) on markers of muscle damage: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Lasers in Medical Science*, v. 29, n. 3, p. 933–938.
- 27 - De Paiva P. R. V. et al. (2016). Photobiomodulation therapy (PBMT) and/or cryotherapy in skeletal muscle restitution, what is better? A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Lasers in Medical Science*. Dec;31(9):1925-1933. Epub 2016.
- 28 - Enoka R. M., Duchateau J. (2008). Muscle fatigue: what, why and how it influences muscle function. *The Journal of Physiology*, v. 586, n. 1, p. 11–23.
- 29 - Ely M. R. et al. (2016). A single dose of histamine-receptor antagonists prior to downhill running alters markers of muscle damage and delayed onset muscle soreness. *Journal of Applied Physiology*, p. jap.00518.2016.
- 30 - Silveira Coswig V. et al. (2016). Biochemical Differences Between Official and Simulated Mixed Martial Arts (MMA) Matches. *Asian Journal of Sports Medicine*, v. Inpress, n. Inpress.
- 31 – Abdelmagid S. M. et al.(2012). Performance of repetitive tasks induces decreased grip strength and increased fibrogenic proteins in skeletal muscle: role of force and inflammation. *PloS One*, v. 7, n. 5, p. e38359.
- 32 - Chatzinikolaou A. et al. (2010). Time course of changes in performance and inflammatory responses after acute plyometric exercise. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*, v. 24, n. 5, p. 1389–1398.
- 33 - Paulsen G. et al. (2010). Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 42, n. 1, p. 75–85.
- 34 - Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Ääriamaa, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. (2007). Muscle injuries: optimizing recovery. *Best Pract Res Clin Rheumt.* 21:317-331.

- 35 - Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F, Uehara K, Fu FH, Huard J. (2008). Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitor effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. *Am J Sports Med.* 36:2354-2362.
- 36 - Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. (2005). Muscles injuries Biology and treatment. *Am J Sports Med.* 33:745-764.
- 37 - Tsai WC, Hsu CC, Chang HN, Lin YC, Lin MS, Pang JH. (2010). Ibuprofen upregulates expressions of matrix metalloproteinase-1, -8, -9, and -13 without affecting expression of types I and III collagen in tendon cells. *J Orthop Res.* 28:487-491.
- 38 – Tomazoni SS, Frigo L, Dos Reis Ferreira TC; Casalechi HL, Teixeira S, De Almeida P, Muscara MN, Marcos RL, Serra AJ, De Carvalho PTC, Leal- Junior ECP. (2017). Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats. - part 2: biochemical aspects. *Lasers Med Sci.*32(8):1879-1887.
- 39 - Tomazoni SS, Frigo L, Dos Reis Ferreira TC; Casalechi HL, Teixeira S, De Almeida P, Muscara MN, Marcos RL, Serra AJ, De Carvalho PTC, Leal- Junior ECP. (2017). Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats—part 1: morphological and functional aspects. *Lasers Med Sci, Dec; V. 32(9)*, p. 2111–2120
- 40 - Assis L, Moretti AI, Abrahão TB, De Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA (2012) Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci* 28:947–955
- 41 - De Almeida P, Tomazoni SS, Frigo L, de Carvalho PT, Vanin AA, Santos LA, Albuquerque-Pontes GM, De Marchi T, Tairova O, Marcos RL, Lopes-Martins RÁ, Leal-Junior EC (2014) What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: lowlevel laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? *Lasers Med Sci* 29:653–658
- 42 - Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. (2015). Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg.* 33:183–184.
- 43 - De Freitas LF, Hamblin MR. (2016). Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 22:348–364
- 44 - Hamblin MR., de Sousa MVP., Agrawal T. (2017). *Handbook of Low-Level Laser Therapy.* Singapore: Pan Stanford Publishing; Hamblin, MR., de Sousa, MVP., Agrawal, T. *Handbook of Low-Level Laser Therapy.* Singapore: Pan Stanford Publishing; 2017
- 45 – Hamblin MR. (2017). Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* 4(3): 337–361.

- 46 – Goldman JA, Chiapella J, Casey H, Bass N, Graham J, McClatchey W, Dronavalli RV, Brown R, Bennett WJ, Miller SB, Wilson CH, Pearson B, Haun C, Persinski L, Huey H, Muckerheide M (1980) Laser therapy of rheumatoid arthritis. *Lasers Surg Med* 1:93–101
- 47- Karu TI (1987) Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quantum Electron* 23:1703–1719
- 48 - Huang YY et al. (2011) Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *DoseResponse: A Publication of International Hormesis Society*, v. 9, n. 4, p. 602–618.
- 49 - De Almeida P, Lopes-Martins RA, De Marchi T, Tomazoni SS, Albertini R, Corrêa JC, Rossi RP, Machado GP, da Silva DP, Bjordal JM, Leal JEC (2012) Red (660nm) and infrared (830 nm) low-level laser therapy in skeletal muscle fatigue in humans: what is better? *Lasers Med Sci* 27:453–458
- 50 - De Marchi T, Schmitt VM, Machado GP, De Sene JS, De Col CD, Tairova O, Salvador M, Leal-Junior ECP (2017). Does photobiomodulation therapy is better than cryotherapy in muscle recovery after a high-intensity exercise? A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* DOI 10.1007/s10103-016-2139-9
- 51 - Borsa PA, Larkin KA, True JM. (2013) Does phototherapy enhance skeletal muscle contractile function and postexercise recovery? A systematic review. *J Athl Train*. 48(1):57–67.
- 52 - Leal-Junior EC, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho PdeT, Dal Corso S, Bjordal JM. (2015) Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with metaanalysis. *Lasers Med Sci*.30(2):925–939.
- 53 - Araújo A L. (2014). Efeitos do uso tópico do óleo de andiroba puro e ozonizado em feridas cutâneas experimentalmente induzidas em equinos. Programa de PósGraduação em Ciência Animal. Universidade de Vila Velha (Dissertação), 2014.
- 54 - Araujo AL et al. (2017), Effects of topical application of pure and ozonized andiroba oil on experimentally induced wounds in horses. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 66-74.
- 55- Han A, Maibach H.I. (2004). Management of Acute Sunburn. *Am J Clin Dermatol*. 5(1): 39-47.
- 56 - Pieper B, Caliri M.H. (2003). Nontraditional wound care: a review of the evidence for use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 30(4):175-83.
- 57 - Hatanaka E, Curi R. (2007). Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Farmacol*. 88(2):53-8

- 58 - Brito NMB et al. (2001). Avaliação macroscópica de feridas cutâneas abertas, em ratos, tratadas com óleo de andiroba. *Rev. Para. Med*, v.15, n.2, p. 17-22.
- 59 - Pennaforte R.J. (2003). Estudo da atividade antiinflamatória de duas espécies de plantas amazônicas. Dissertação de Mestrado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 70p.
- 60 - Casalechi, H. L. et al. (2009). The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers in Medical Science*, v. 24, n. 4, p. 659–665.
- 61 - Serafim, K. G. G. et al. (2012). Effects of 940 nm light-emitting diode (led) on sciatic nerve regeneration in rats. *Lasers in Medical Science*, v. 27, n. 1, p. 113–119.
- 62 – Brito MVH et al. (2006). Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos. *Rev. Para. Med. Belém*. v.20 n.2
- 63- Nogueira G. B. (2012). Efeito do meloxicam e laser de baixa intensidade na terapêutica de lesões musculares induzidas em ratos. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2012.
- 64 - Winterbourn C.C., Gutteridge J.M., Halliwell B. (1985). Doxorubicin dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. *J Free Radic Biol Med*. 1(1):43-49.
- 65 – Aebi H. et al. (1975). Mechanism and biological role of the peroxidase action of catalase. *Bull Scoc Chim Biol*. vol. 52 p. 187-207.
- 66- Flohe L, Gunzler W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, vol. 105, p. 114-21.
- 67- Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. (2011). The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. *Inflamm Res*. 60(4):347–356
- 68 - Renno AC, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, Parizotto N, Ribeiro DA. (2011). Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed Laser Surg*. 29(1):5–10.
- 69 -Li Y, Cummins J, Huard J. (2001). Muscle injury and repair. *Curr Opin Orthop*. 12:6.
- 70 - Tidball JG. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288(2):R345–R353.
- 71 - Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82(1):47– 95.

- 72 - Adams V, Nehrhoff B, Spate U, Linke A, Schulze PC, Baur A, Gielen S, Hambrecht R, Schuler G. (2002). Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: An in vitro and in vivo study. *Cardiovasc Res.* 54(1):95–104.
- 73 - Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A. (2001). Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr.* 86(Suppl 1):S121–S127.
- 74- Huard J, Li Y, Fu FH. (2002). Muscle injuries and repair: Current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 84-A (5):822–832.
- 75- Barnes PJ, Karin M. (1997). Nuclear factor-kappaB: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 336(15):1066–1071.
- 76 - Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J.* 18(2):227–237.
77. Buford TW, Cooke MB, Shelmadine BD, Hudson GM, Redd L, Willoughby DS. (2009). Effects of eccentric treadmill exercise on inflammatory gene expression in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 34(4):745–753.
- 78 - Douris P, Southard V, Ferrigi R, Grauer J, Katz D, Nascimento C, Podbielski P. (2006). Effect of phototherapy on delayed onset muscle soreness. *Photomed Laser Surg.* 24(3):377–382.
- 79 - Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Frigo L, De Marchi T, Rossi RP, de Godoi V, Tomazoni SS, Silva DP, Basso M, Filho PL, de Valls Corsetti F, Iversen VV, Bjordal JM. (2010). Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise-induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. *J Orthop Sports Phys Ther.* 40(8): 524–532.
- 80 - Servetto N, Cremonozzi D, Simes JC, Moya M, Soriano F, Palma JA, Campana VR. (2010). Evaluation of inflammatory bio-markers associated with oxidative stress and histological assessment of lowlevel laser therapy in experimental myopathy. *Lasers Surg Med.* 42(6):577–583.
- 81- Tatmatsu-Rocha JC, Ferraresi C, Hamblin MR et al. (2016) Low-level laser therapy (904 nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. *J Photochem Photobiol B.* 164:96–102.
- 82 -De Marchi T, Leal Junior EC, Bortoli C et al.(2012). Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci.* 27:231–236.
- 83 - Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K et al. (2005). Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005; 37:293–300.

- 84 - Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. (2011). Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE*. 6(7):e22453.
- 85 - Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Corrêa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, González-Gallego J (2006). 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
- 86 - Liu XG, Zhou YJ, Liu TC, Yuan JQ (2009) Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed Laser Surg* 27:863–869
- 87 – Ribeiro B G, Alves A N, Dos Santos L. A. D., Cantero T M, Fernandes K P S, Dias DS et al. (2016) Red and Infrared Low-Level Laser Therapy .Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. *PLoS ONE* 11(4):e0153618
- 88 – Yomasa D. M. I.; Garavelo M. M., Iyomasa I. S., Watanabe J. P. Issa (2009) Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the gerbil. *Micron* 40, 413–418.
- 89 - Silveira PC, Scheffer Dda L, Glaser V et al. (2016). Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free Radic Res*. 50:503–513.
- 90- De Almeida P, Lopes-Martins RÁ, Tomazoni SS, AlbuquerquePontes GM, Santos LA, Vanin AA, Frigo L, Vieira RP, Albertini R, de Carvalho PT, Leal-Junior EC (2013) Low-level laser therapy and sodium diclofenac in acute inflammatory response induced by skeletal muscle trauma: effects in muscle morphology and mRNA gene expression of inflammatory markers. *Photochem Photobiol* 89:501–507
- 91 - Rodrigues NC, Brunelli R, Abreu DC, Fernandes K, Parizotto NA, Renno AC (2014) Morphological aspects and Cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: an in vivo study. *Braz J Phys Ther* 18:395–401
92. Albertin R. et al. (2007). Cox-2 mRNA expression decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 56, n. 6, p. 228-229.
- 93 – Chamusca FV, Reis SRA, Lemaire D, Medrado AP (2012). Mediators of the systemic effects of inflammation and photobiomodulatory therapies: a literature review. *R. Ci. med. biol.*, Salvador, v.11, n.1, p.70-78.
- 94 – Musarò A. (2014). The basis of muscle regeneration. *Adv Biol*:1–16
- 95 – Kalimo H, Rantanen J, Järvinen. M (1997) Muscle injuries in sports. *Baillieres Clin Orthop* 2:1–24.

96 Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK (2004) The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C475–C483

97 - Fukuda TY, Tanji MM, Jesus JF, Sato NM, Duarte AJ, Plapler H (2010) Single session to infrared low level diode laser on TNF- α and IL-6 cytokines release by mononuclear spleen cells in mice: a pilot study. *Lasers Surg Med* 42:584–588

98 -Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK (1999) Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 515:287–291

99- Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK (2000) Physical activity and plasma interleukin-6 in humans—effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol* 83:512–515

100- Basford JR, Sheffield CG, Harmsen WS (1999). Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low-intensity Nd:YAG laser irradiation on musculoskeletal back pain. *Arch Phys Med Rehabil* 80:647–652

101- Gur A, Sarac AJ, Cevik R, Altindag O, Sarac S (2004) Efficacy of 904nm gallium arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: a double-blind and randomized-controlled trial. *Lasers Surg Med* 35:229–223

102- Leal Junior ECP, Lopes-Martins RA, Dalan F, Ferrari M, Sbabo FM, Generosi RA, Baroni BM, Penna SC, Iversen VV, Bjordal JM (2008) Effect of 655-nm low-level laser therapy on exercise induced skeletal muscle fatigue in humans. *Photomed Laser Surg* 26:419–424

103- Leal Junior ECP, Lopes-Martins RA, Rossi RP, De Marchi T, Baroni BM, De Godoi V, Marcos RL, Ramos L, Bjordal JM (2009) Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers Surg Med* 41:572–577.

104- Leal Junior ECP, Lopes-Martins RA, Vanin AA, Baroni BM, Grosselli D, De Marchi T, Iversen VV, Bjordal JM (2009) Effect of 830nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci* 24:425–43.

105- Konstantinovic LM, Kanjuh ZM, Milovanovic AN, Cutovic MR, Djurovic AG, Savic VG, Dragin AS, Milovanovic ND (2010) Acute low back pain with radiculopathy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Photomed Laser Surg* 28:553–560.

106- Marcos RL, Leal Junior ECP, Messias F de M, De Carvalho MH, Pallotta RC, Frigo L, Dos Santos RA, Ramos L, Teixeira S, Bjordal JM, Lopes-Martins RÁ (2011) Infrared (810 nm) low level laser therapy in rat achilles tendinitis: a consistent alternative to drugs. *Photochem Photobiol* 87:1447–1452

107- Leal Junior ECP, De Godoi V, Mancalossi JL, Rossi RP, De Marchi T, Parente M, Grosselli D, Generosi RA, Basso M, Frigo L, Tomazoni SS, Bjordal JM, Lopes-

Martins RA (2011) Comparison between cold water immersion therapy (CWIT) and light emitting diode therapy (LEDT) in short-term skeletal muscle recovery after high intensity exercise in athletes—preliminary results. *Lasers Med Sci* 26:493–501.

108- Da Rosa AS, Dos Santos AF, Da Silva MM, Facco GG, Perreira DM, Alves AC, Leal Junior ECP, De Carvalho PT. (2012) Effects of low-level laser therapy at wave lengths of 660 and 808nm in experimental model of osteoarthritis. *Photochem Photobiol* 88:161–166.

109- Marcos RL, Leal-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, de Carvalho MH, LopesMartins RÁ (2012) Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res* 30:1945–1951.

110- Aparecida S A, Leal-Junior ECP, Alves AC, Rambo CS, Dos Santos SA, Vieira RP, De Carvalho P de T (2013) Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. *J Cosmet Laser Ther* 15:210–216.

111- Tomazoni SS, Leal-Junior EC, Frigo L, Pallotta RC, Teixeira S, de Almeida P, Bjordal JM, Lopes-Martins RÁ (2016) Isolated and combined effects of photobiomodulation therapy, topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and physical activity in the treatment of osteoarthritis induced by papain. *J Biomed Opt* 21:108001.

112- Tomazoni SS, Leal-Junior EC, Pallotta RC, Teixeira S, De Almeida P, Lopes-Martins RÁ (2017). Effects of photobiomodulation therapy, pharmacological therapy, and physical exercise as single and/or combined treatment on the inflammatory response induced by experimental osteoarthritis. *Lasers Med Sci* 32:101–108

113- Leal-Junior EC, de Almeida P, Tomazoni SS, de Carvalho PT, Lopes-Martins RÁ et al (2014). Superpulsed low-level laser therapy protects skeletal muscle of mdx mice against damage, inflammation and morphological changes delaying dystrophy progression. *PLoS One* 9:e89453

114- Ribeiro BG, Alves AN, Santos LA, Fernandes KP, Cantero TM, Gomes MT, França CM, Silva DF, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA (2015) The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers Surg Med* 47:571–578

115- Simpson, R.J. et al. (1997). Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Sci. New York*. v. 6, n.5, p. 929-955.

116- Alves AN, Ribeiro BG, Fernandes KP, Souza NH, Rocha LA, Nunes FD, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA (2016) Comparative effects of low-level laser therapy pre- and postinjury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci* 31:679–685

117- Kurosaka M, Machida S (2013) Interleukin-6-induced satellite cell proliferation is regulated by induction of the JAK2/STAT3 signalling pathway through cyclin D1 targeting. *Cell Prolif* 46:365–373

118- Pedersen BK (2007) IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans* 35:1295–1297

119. Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, dos Reis FA, Albertini R, de Almeida P, Leal Junior EC, De Tarso Camillo de Carvalho P (2012) Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochem Photobiol* 88:1546–1550.

120- Wu JY, Chen CH, Wang CZ, Ho ML, Yeh ML, Wang YH (2013) Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF- κ B activity. *PLoS One* 8:1–9

121- Tappin MRR, Nakamura MJ, Siane AC, Lucchetti L. (2008). Development of a HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*. 2008; 48(4): 1090-95.

122 - Dias AM, Abad MJ, fernandez L, Recuero C, Villaescusa L, Silvan AM, Bermejo P. (2000). In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea LATIFOLIA* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 23(11):1307-13.

123 - Shin SG, Kang JK, Lee Kr, Lee HW, Han JW, Choi WS. (2005). Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW-264.7 macrophages by sesquiterpenes lactones. *Journal of toxicology and environmental Health. Part A*. 68 (23-24): 2119-31.

124 - Castello Branco Neto M. L. (2013). Avaliação de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e de *Carapa guianensis* Aublet (andiroba) na cicatrização de feridas em pele de ratos: estudo morfológico e imunológico. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Princípios da Cirurgia) - Instituto de Pesquisas Médicas, Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, 2013

ANEXOS

Anexo 1- Parecer do Comitê de ética


 UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
 CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
 COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo n° 24/2016

Título do Projeto de Pesquisa: Os efeitos do laser de baixa potência e do óleo de andiroba em marcadores bioquímicos inflamatórios na lesão muscular aguda em ratos.

Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Tereza Cristina dos Reis Ferreira
 Instituição: Universidade do Estado do Pará

Data do Parecer: 25/08/2016

PARÉCER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do CONCEA. O referido projeto utiliza 65 exemplares pertencentes a espécie *Rattus norvegicus*, com 60 dias e peso de 120g a 250g, para fins de pesquisa, tratando-se de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata, do sexo masculino, originários da Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório (SACPA) do Instituto Evandro Chagas. Desse modo, após as avaliações o CEUA-UEPA, manifesta-se pela sua aprovação.

O projeto será desenvolvido no período de 10/2016 a 10/2017.

Parecer: **APROVADO**

Liberado para o início da pesquisa sendo obrigatória a entrega neste CEUA do relatório semestral e a conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 31 de agosto de 2016.


 Prof. Dr. Nelson Antonio Baillão Ribeiro
 Coord. do CEUA/CCBS/UEPA

Prof. Dr. Nelson Antonio Baillão Ribeiro
 Coord. do CEUA/CCBS/UEPA


 Universidade do Estado do Pará - UEPA - Campus II / CCBS
 Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA. End.: Trav. Ferebebuí nº 2623 - Marco - CEP: 66087-670
 Belém/Pará. Fone: (91) 3276-3387, e-mail: ceua@uepa.ufpa.br


Anexo 2- Realizações durante o doutorado.

Artigo 1

Lasos Med Sci (2017) 32:2111–2120
<https://doi.org/10.1007/s10103-017-2346-z>



ORIGINAL ARTICLE

Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats—part 1: morphological and functional aspects

Shaiene Silva Tomazoni¹ · Lúcio Frigo² · Tereza Cristina dos Reis Ferreira^{3,4} · Heliodora Leão Casalechi³ · Simone Teixeira⁵ · Patrícia de Almeida⁶ · Marcelo Nicolas Muscara⁵ · Rodrigo Lahat Marcos⁶ · Andrey Jorge Serra⁶ · Paulo de Tarsu Camillo de Carvalho^{4,6} · Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior^{3,4}

Received: 17 June 2017 / Accepted: 28 September 2017 / Published online: 5 October 2017
 © Springer-Verlag London Ltd. 2017

Abstract Musculoskeletal injuries are very frequent and are responsible for causing pain and impairment of muscle function, as well as significant functional limitations. In the acute phase, the most prescribed treatment is with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), despite their questionable effectiveness. However, the use of photobiomodulation therapy (PBMT) in musculoskeletal disorders has been increasing in the last few years, and this therapy appears to be an interesting alternative to the traditional drugs. The objective of the present study was to evaluate and compare the effects of PBMT, with different application doses, and topical NSAIDs, under morphological and functional parameters, during an acute inflammatory process triggered by a controlled model of musculoskeletal injury induced via contusion in rats.

Muscle injury was induced by means of a single trauma to the animals' anterior tibialis muscle. After 1 h, the rats were treated with PBMT (830 nm; continuous mode, with a power output of 100 mW; 3.57 W/cm²; 1 J–35.7 J/cm², 3 J–107.1 J/cm², and 9 J–321.4 J/cm²; 10, 30, and 90 s) or diclofenac sodium for topical use (1 g). Morphological analysis (histology) and functional analysis (muscle work) were performed, 6, 12, and 24 h after induction of the injury. PBMT, with all doses tested, improved morphological changes caused by trauma; however, the 9 J (321.4 J/cm²) dose was the most effective in organizing muscle fibers and cell nuclei. On the other hand, the use of diclofenac sodium produced only a slight improvement in morphological changes. Moreover, we observed a statistically significant increase of muscle work in the PBMT 3 J (107.1 J/cm²) group in relation to the injury group and the diclofenac group ($p < 0.05$). The results of the present study indicate that PBMT, with a dose of 3 J (107.1 J/cm²), is more effective than the other doses of PBMT tested and NSAIDs for topical use as a means to improve morphological and functional alterations due to muscle injury from contusion.

✉ Shaiene Silva Tomazoni
shaiene.tomazoni@gmail.com

¹ Masters and Doctoral Programs in Physical Therapy, Universidade Cidade de São Paulo (UNICID), Rua Cosme Galeno, 448/475, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

² Biological Sciences and Health Center, Cruzeiro do Sul University (UNICSUL), São Paulo, SP, Brazil

³ Laboratory of Phototherapy in Sports and Exercise, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

⁴ Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

⁵ Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁶ Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

Keywords Photobiomodulation therapy · Low level laser therapy · Phototherapy · Skeletal muscle injury · Contusion · Topical non-steroidal anti-inflammatory drug

Introduction

Musculoskeletal injuries are very frequent and represent a challenging traumatology problem, since they account for up to 30% of all injuries in the practice of professional sports [1].



Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats—part 2: biochemical aspects

Shaiene Silva Tomazoni¹ · Lúcio Frigo² · Tereza Cristina dos Reis Ferreira^{3,4} · Heliodora Leão Casalechi³ · Simone Teixeira⁵ · Patrícia de Almeida⁶ · Marcelo Nicolas Muscara⁵ · Rodrigo Labat Marcos⁶ · Andrey Jorge Serra⁶ · Paulo de Tarsu Camillo de Carvalho^{4,6} · Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior^{3,4}

Received: 4 June 2017 / Accepted: 31 July 2017 / Published online: 9 August 2017
© Springer-Verlag London Ltd. 2017

Abstract Muscle injuries trigger an inflammatory process, releasing important biochemical markers for tissue regeneration. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is the treatment of choice to promote pain relief due to muscle injury. NSAIDs exhibit several adverse effects and their efficacy is questionable. Photobiomodulation therapy (PBMT) has been demonstrated to effectively modulate inflammation induced from musculoskeletal disorders and may be used as an alternative to NSAIDs. Here, we assessed and compared the effects of different doses of PBMT and topical NSAIDs on biochemical parameters during an acute inflammatory process triggered by a controlled model of contusion-induced musculoskeletal injury in rats. Muscle injury was induced by trauma to the anterior tibial muscle of rats. After 1 h, rats were treated with PBMT (830 nm, continuous mode, 100 mW of power, 35.71 W/cm²; 1, 3, and 9 J; 10,

30, and 90 s) or diclofenac sodium (1 g). Our results demonstrated that PBMT, 1 J (35.7 J/cm²), 3 J (107.1 J/cm²), and 9 J (321.4 J/cm²) reduced the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and cyclooxygenase-2 (COX-2) genes at all assessed times as compared to the injury and diclofenac groups ($p < 0.05$). The diclofenac group showed reduced levels of COX-2 only in relation to the injury group ($p < 0.05$). COX-2 protein expression remained unchanged with all therapies except with PBMT at a 3-J dose at 12 h ($p < 0.05$ compared to the injury group). In addition, PBMT (1, 3, and 9 J) effectively reduced levels of cytokines TNF- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6 at all assessed times as compared to the injury and diclofenac groups ($p < 0.05$). Thus, PBMT at a 3-J dose was more effective than other doses of PBMT and topical NSAIDs in the modulation of the inflammatory process caused by muscle contusion injuries.

✉ Shaiene Silva Tomazoni
shaiene.tomazoni@gmail.com

¹ Masters and Doctoral Programs in Physical Therapy, Universidade Cidade de São Paulo (UNICID), Rua Cosme Veloso, 448/475, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

² Biological Sciences and Health Center, Cruzeiro do Sul University (UNICSUL), São Paulo, SP, Brazil

³ Laboratory of Phototherapy in Sports and Exercise, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

⁴ Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

⁵ Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁶ Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

Keywords Photobiomodulation therapy · Low level laser therapy · Skeletal muscle injury · Contusion · Topical non-steroidal anti-inflammatory drug

Introduction

Muscle injuries during sports are common [1, 2] and may be triggered by different mechanisms such as contusion, stretching, and laceration [3]. However, the associated morphological, metabolic, and biochemical changes are similar regardless of the type and mechanism of injury [4].

The process of muscle regeneration following muscle injury is complex and involves molecular and cellular signaling [5]. Muscle regeneration involves three phases: destruction,