



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA  
ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**SIMONE SILVA DOS SANTOS**

**ESTUDO DO PAPEL DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA  
MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO MUSCULAR INDUZIDO PELO  
EXERCÍCIO RESISTIDO EM RATAS**

**São Paulo, SP**

**2019**

**SIMONE SILVA DOS SANTOS**

**ESTUDO DO PAPEL DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA  
MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO MUSCULAR INDUZIDO PELO  
EXERCÍCIO RESISTIDO EM RATAS**

Dissertação apresentada à Universidade  
Nove de Julho para obtenção do título de  
mestre em Biofotônica Aplicada às  
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Andrey Jorge Serra

**São Paulo, SP**

**2019**

Santos, Simone Silva dos.

Estudo do papel do laser de baixa intensidade na modulação do estresse oxidativo muscular induzido pelo exercício resistido em ratas. / Simone Silva dos Santos 2019.

34 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof. Dr. Andrey Jorge Serra.

1. Exercício resistido. 2. Estresse oxidativo. 3. Laser em baixa intensidade. 4. Atividade enzimática. 5. Antioxidante.

I. Serra, Andrey Jorge. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 29 de abril de 2019

**TERMO DE APROVAÇÃO**

AJuno (a): Simone Silva dos Santos

Título da Discertação: "Estudo do papel do laser de baixa intensidade na modulação do estresse oxidativo muscular induzido pelo exercício físico resistido em ratas"

Presidente: PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA \_\_\_\_\_

Membro: PROF. DR. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA

Ana Carolina Ratto

Membro: PROF. DR. GISELA ARRAUDA DA SILVA

Gisela Arraуда da Silva

## RESUMO

O estresse oxidativo compreende a circunstância em que há desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e os sistemas de defesa antioxidante, o que resulta em lesão e disfunção celular. Nesse cenário, há dados suficientes para considerar o exercício físico como condição indutora de aumento da produção de radicais livres. Decorre que, o estresse oxidativo induzido pelo exercício aumenta o risco de dano muscular, resultando em disfunção celular e no retardo do processo de recuperação. A alta incidência de lesões musculares principalmente em períodos intensos de treinamento, tem repercutido diretamente no número crescente de estudos que buscam uma forma de minimizar o dano oxidativo, e conseqüentemente, acelerar o reparo tecidual. Neste contexto, o laser em baixa intensidade (LBI) tem surgido como uma opção para minimizar o dano oxidativo e modular a reparação tecidual. Diferentes estudos têm demonstrado efeitos positivos do LBI quando aplicada previamente e após exercício resistido na redução de marcadores bioquímicos de dano muscular e na modulação do processo inflamatório. No entanto, existe a necessidade de novos estudos para uma melhor elucidação sobre os efeitos do LBI aplicada previamente ao exercício resistido. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da aplicação prévia do LBI sobre marcadores de estresse oxidativo em modelo experimental de exercício resistido em ratas. Foram utilizadas 60 ratas de linhagem Wistar, divididas aleatoriamente em 5 grupos experimentais: (1) Sham (n=12); (2) Ctr (n=12); (3) LBI 4 J (n=12); (4) LBI 8 J (n=12) e (5) LBI 12 J (n=12). Os animais foram submetidos à uma sessão de exercício, que consistiu em quatro subidas na escada transportando a carga máxima. Para o tratamento com LBI foi utilizado o laser infravermelho (830 nm, potência de saída 100 mW, área do feixe de 0,0028 cm<sup>2</sup>, energias totais de 4, 8 e 12 J e tempos de irradiações 40, 80 e 120 segundos, respectivamente). A irradiação foi realizada em 3 pontos (proximal, medial e distal) no músculo gastrocnêmio, de ambos os membros inferiores. Após a irradiação, os animais foram submetidos a sessão de exercício resistido. Na sequência, os animais foram eutanasiados e o músculo gastrocnêmio direito coletado para análise de marcadores de estresse oxidativo (malondialdeído [MDA], 4-hidroxinonal [4-HNE], oxidação proteica, superóxido dismutase [SOD] e catalase [CAT]). Os resultados demonstraram que o LBI em suas diferentes doses foi capaz de modular o estresse oxidativo reduzindo a imunomarcagem de 4-HNE e redução das proteínas oxidadas dos grupos irradiados com 8 e 12 J, quando comparado ao grupo de exercício resistido não irradiado. Já em relação a enzima SOD, foi possível observar o

aumento de sua atividade nas diferentes doses de energia (4, 8 e 12 J) em relação ao grupo de exercício resistido não irradiado. Em conclusão, o tratamento com LBI em diferentes doses de irradiação (4, 8 e 12 J) modulou o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a uma sessão de exercício resistido de alta intensidade, prevenindo o aumento na lipoperoxidação, melhora na defesa antioxidante ligada à atividade enzimática da SOD e doses maiores resultaram em normalização dos níveis de oxidação proteica.

**Palavras-chave:** exercício resistido, estresse oxidativo, laser em baixa intensidade, atividade enzimática, antioxidante.

## ABSTRACT

Oxidative stress comprises the circumstance in which there is imbalance between the generation of oxidizing agents and the antioxidant defense systems, which results in injury and cellular dysfunction. In this context, there is enough data to consider physical exercise as an inducing condition for increased production of free radicals. It follows that, oxidative stress induced by exercise increases the risk of muscle damage resulting in cellular dysfunction and delay the recovery process. The high incidence of muscle injuries mainly during intense periods of training has directly affected the growing number of studies that seek a way to minimize oxidative damage and, consequently, to accelerate the tissue repair. In this context, low-level laser therapy (LLLT) has emerged as an option to minimize oxidative damage and modulate tissue repair. Different studies have showed positive effects of LLLT when applied before and after resistance exercise in the reduction of biochemical markers of muscle damage and modulation of the inflammatory process. The objective of the present study was to evaluate the effects of previous application of LLLT on oxidative stress markers in experimental model of resistance exercise in rats. Sixty Wistar rats were randomly divided into five experimental groups: (1) Sham (n = 12); (2) Control (n = 12); (3) LLLT 4 J (n = 12); (4) LLLT 8 J (n = 12) and (5) LLLT 12 J (n = 12). The animals were submitted to only one exercise session, which consisted of four climbs on the ladder carrying the maximum load. For LLLT, infrared laser (830 nm, output power 100 mW, beam area 0.0028 cm<sup>2</sup>, total energies of 4, 8 and 12 J and irradiation times 40, 80 and 120 seconds, respectively) were used. Irradiation was performed in 3 points (proximal, medial and distal) in the gastrocnemius muscle of both lower limbs. After irradiation, the animals were submitted to a resistance exercise session. Afterwards, the animals were euthanized and the right gastrocnemius muscle collected for analysis of oxidative stress markers (malondialdehyde [MDA], 4-hydroxynonenal [4-HNE], protein oxidation, superoxide dismutase [SOD] and, catalase [CAT]). The results showed that LLLT in its different doses was able to modulate the oxidative stress reducing the immunoblot of 4-HNE and reduction of the oxidized proteins of the groups irradiated with 8 and 12 J, when compared to the non-irradiated resistance exercise group. In relation to SOD enzyme, it was possible to observe the increase of its activity in the different energy doses (4, 8 and 12 J) in relation to the non-irradiated resistance exercise group. In conclusion, LLLT treatment at different irradiation doses (4, 8 and 12 J) modulated the

oxidative stress in the gastrocnemius muscle of rats submitted to a high-intensity resistance exercise session, preventing an increase in lipoperoxidation, improvement in defense antioxidant activity linked to the enzymatic activity of SOD and higher doses resulted in normalization of protein oxidation levels.

**Keywords:** resistance exercise, oxidative stress, low level laser therapy, enzymatic activity, antioxidant.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO .....</b>	<b>16</b>
3.1 Grupos experimentais e desenho do estudo.....	16
3.2 Teste de carga máxima e protocolo de exercício resistido .....	17
3.3 Parâmetros de irradiação com LBI .....	18
3.4 Desempenho físico.....	20
3.5 Coleta de material biológico .....	20
3.6 Estresse oxidativo .....	20
3.6.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	20
3.6.2 Mensuração do 4-hidroxinonenal (4-HNE).....	20
3.6.3 Oxidação proteica.....	21
3.6.4 Western blot .....	21
3.6.5 Atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).....	22
3.7 Análise estatística .....	22
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>29</b>

Tabela 1. Parâmetros de irradiação.....	16
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma experimental.....	16
Figura 2. Imagem ilustrativa da fase adaptativa do protocolo experimental .....	17
Figura 3. Pontos de aplicação do LBI no músculo gastrocnêmio.....	18
Figura 4. Testes de desempenho físico durante o exercício resistido em animais não irradiados (grupo RNI) e submetidos previamente a diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). .....	22
Figura 5. Marcadores de lipoperoxidação muscular em ratas não exercitadas (Ctr) e submetidas ao exercício resistido sem (grupo RNI) ou com aplicação prévia de diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). .....	23
Figura 6. Conteúdo de proteína oxidada muscular em ratas não exercitadas (Ctr) e submetidas ao exercício resistido sem (grupo RNI) ou com aplicação prévia de diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). .....	23
Figura 7. Atividade muscular da enzima catalase (CAT) em ratas não exercitadas (Ctr) e submetidas ao exercício resistido sem (grupo RNI) ou com aplicação prévia de diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). .....	24
Figura 8. Atividade muscular da enzima superóxido dismutase (SOD) em ratas não exercitadas (Ctr) e submetidas ao exercício resistido sem (grupo RNI) ou com aplicação prévia de diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente).....	24

## 1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo compreende a circunstância em que o aumento de radicais livres resulta em aumento na produção de compostos citotóxicos ou em lesão tecidual. Assim, depreende-se que o acúmulo de radicais livres resulte em alterações estruturais em proteínas e no DNA, o que perpetua em prejuízo da função e integridade celular (Halliwell, 2007; Handy e Loscalzo, 2012).

O organismo possui mecanismos químicos e enzimáticos aptos a modular os níveis de radicais livres. Dentre os mecanismos químicos destacam-se o tocoferol (vitamina E), o betacaroteno, o selênio, o cobre, o zinco e o ácido ascórbico (Yu, 1994; Sen, 2001; Nikolaidis *et al.*, 2012). Como mecanismo enzimático destaca-se a atuação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) enzimas em decomponem ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e lipoperóxidos (Yu, 1994; Nikolaidis *et al.*, 2012).

Desperta interesse o fato do exercício físico induzir aumento na produção de radicais livres. Tal premissa é pautada no preceito de que há maior formação de radicais livres em decorrência de aumento do consumo de  $O_2$  (Sen, 2001). Toma-se como exemplo o estudo de Michailidis *et al.* (2007) conduzido em adultos jovens submetidos a exercício aeróbio à 90% do consumo máximo de oxigênio. Os autores documentaram aumento significativo de múltiplos marcadores de estresse oxidativo (ex.: malonaldeído e glutathiona oxidada) e redução da capacidade antioxidante total no seguimento de quatro horas pós-exercício. Outros investigadores também reportaram aumento na concentração sérica de malonaldeído induzido pelo exercício aeróbio em humanos (Ashton *et al.*, 1999; Radak *et al.*, 2003) e animais de laboratório (Liu *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2009). Considera-se, ainda, o preceito que, em músculos submetidos a contrações isotônicas vigorosas, como ocorre durante o exercício resistido, há aumento do estresse oxidativo como resultado da hipóxia/reperfusão muscular intermitente, do aumento na concentração de lactato, de catecolaminas e do processo inflamatório (Bloomer & Goldfarb *et al.*, 2004; Cruzat *et al.*, 2007). Singular a essas informações, McBride *et al.* (1998) reportaram aumento significativo nos níveis séricos de malonaldeído com seis e 24 horas após sessão de exercícios resistidos. Em outro estudo, notou-se elevação de hidroperóxidos no plasma de homens que realizaram contrações musculares a 80% da carga máxima (Child *et al.*, 2001). Hudson *et al.* (2008) demonstraram aumento na concentração de proteínas carboniladas em homens

saudáveis imediatamente e 60 minutos pós-exercício resistido conduzido a 75% e 90% da carga máxima. Deminice *et al.* (2010), ao submeterem jovens treinados a uma sessão de exercício resistido (três séries de 10 repetições; 75% da carga máxima), identificaram concentrações séricas elevadas de lactato, malonaldeído e produtos de oxidação com 10 minutos do término da sessão de exercício.

De importância é a associação entre aumento do estresse oxidativo maior dano muscular e fadiga despertados pelo exercício resistido de alta intensidade (Cruzat *et al.*, 2007; Benitez-Sillero *et al.*, 2011). Toma-se, como exemplo, achados que associam o aumento do estresse oxidativo com intensificação da dor muscular e inflamação, circunstância que persiste por horas após o exercício (Nikolaidis *et al.*, 2008; Retamoso *et al.*, 2016). Acresça-se que, níveis elevados de estresse oxidativo pós-exercício pode resultar em recuperação muscular morosa, interferindo na qualidade das sessões de treinamento subsequentes (Bessa *et al.*, 2016). Essa situação é particularmente evidente durante períodos intensos de treinamento, em que a liberação de radicais livres pode ser superior capacidade protetora dos sistemas antioxidantes (Slatery *et al.*, 2015). Esse cenário fundamenta o uso de suplementação nutricional antioxidante como tentativa de contrapor o aumento do estresse oxidativo despertado pelo exercício (Urso & Clarkson, 2003; Pingitore *et al.*, 2015). Todavia, a suplementação pode resultar em diversos inconvenientes, como prejudicar a adaptação muscular ao treinamento físico por inibir um fenômeno similar à hormesis (Sunemi *et al.*, 2019) e causar sintomas adversos como broncoespasmo, fadiga, taquicardia, diarreia, náusea e vômito (Antonioni *et al.*, 2019).

As informações precedentes incitam a procura de alternativas antioxidantes desprovidas dos inconvenientes que vigoram na suplementação alimentar. De nosso interesse, emerge o possível papel do laser em baixa intensidade (LBI) frente ao estresse oxidativo excessivo despertado pelo exercício. Cita-se como exemplo um estudo conduzido em camundongos com distrofia muscular de Duchenne, em que a aplicação do LBI prévia ao exercício aeróbio exaustivo resultou em atenuação da lesão e estresse oxidativo musculares (Silva *et al.*, 2015).

Os achados acima são animadores para acreditar que o LBI pode ser usual quando aplicado antes de sessões de treinamentos ou competições em que vigora estresse oxidativo muscular excessivo. Todavia, a quantidade limitada de estudos com essa temática dificulta aceitar com solidez o LBI como ferramenta de ação antioxidante, o que desperta a necessidade de mais investigação. Acresça-se, ainda, a necessidade de avaliar o papel do LBI em exercícios de demanda metabólica anaeróbia,

como o exercício resistido. Decorre que, a efetividade do LBI em modular o estresse oxidativo induzido pelo exercício aeróbio não implica em ação similar para atividades anaeróbias. É aceito que exercícios anaeróbios têm peculiaridades em comparação com atividades aeróbios, incluindo a ativação motora (fibras tipo II vs. tipo I), a via metabólica preponderante e a resposta adaptativa muscular a longo prazo (MacArdle *et al.*, 2011; Lundby & Jacobs, 2016; Petriz *et al.*, 2017).

O primeiro estudo que analisou a repercussão da fotobiomodulação na resposta muscular ao exercício anaeróbio aplicou diodo emissor de luz (LED) em ratos submetidos a 14 dias de treinamento resistido (Ferraresi *et al.*, 2016). O LED foi aplicado antes de cada sessão de exercício e resultou em melhora do desempenho físico e de marcadores antioxidantes. Recentemente, em um estudo publicado por nosso grupo de pesquisa (de Oliveira *et al.*, 2018a), a aplicação de LBI antes de uma sessão de exercício resistido aboliu o aumento na lipoperoxidação e carbonilação musculares despertadas pelo exercício resistido. A ideia que vigora nesta proposta nova foi determinar se os efeitos antioxidantes do LBI poderiam ser dose-dependentes. A premissa para tal hipótese provém de outro estudo de nosso grupo, em que os efeitos do LBI foram dose- dependentes em atenuar a necrose e inflamação musculares em ratos submetidos à exercício resistido (Oliveira *et al.*, 2018b).

## **2. OBJETIVOS**

- Analisar o efeito do LBI, aplicado antes do exercício resistido de carga máxima, no estresse oxidativo muscular-esquelético;
- Caracterizar se os possíveis efeitos benéficos do LBI são dose dependentes.

### 3. MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1 Grupos experimentais e desenho do estudo

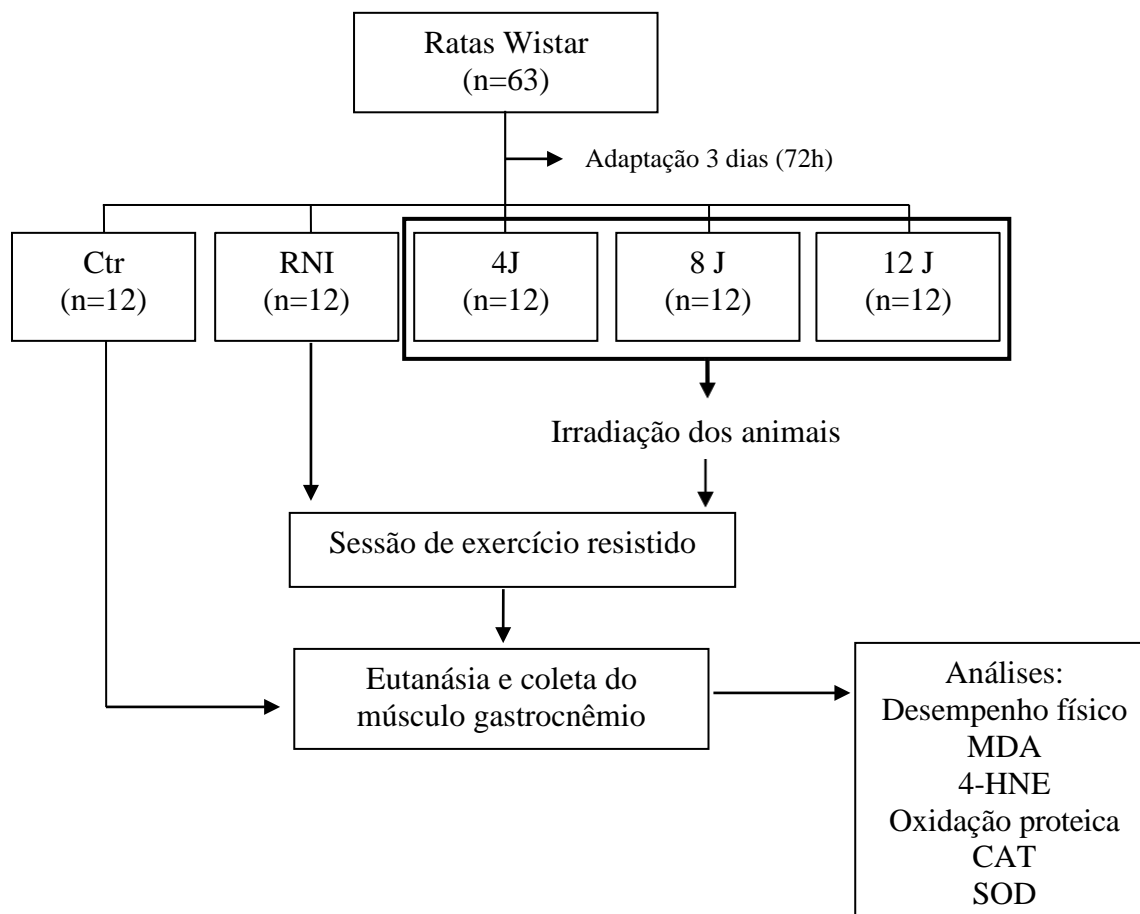
Um total de 60 ratas de linhagem Wistar, com 12 semanas de idade e peso corporal entre 200 e 250g, foram utilizadas no estudo. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove Julho (AN008.2017). As ratas foram mantidas no biotério sob condições controladas de umidade do ar (50% - 60%), luminosidade (12h claro/12h escuro) e temperatura ambiente (22°C-25°C).

As ratas foram distribuídas aleatoriamente para um dos seguintes grupos experimentais:

- Não exercitado e não irradiado (Ctr, n=12) – ratas não submetidas ao exercício resistido e LBI placebo (o equipamento foi posicionado nos pontos de irradiação, porém permaneceu no modo desligado);
- Exercitado e não irradiado (RNI, n=12) – ratas submetidas ao exercício resistido e não irradiadas com LBI (a ponteira foi posicionada no ponto de irradiação, porém o equipamento permaneceu no modo desligado);
- Exercitado e irradiado com 4 J de energia (4 J, n=12);
- Exercitado e irradiado com 8 J de energia (8 J, n=12);
- Exercitado e irradiado com 12 J de energia (12 J, n=12).

O procedimento experimental pode ser visualizado na Figura 1.





**Figura 1.** Fluxograma experimental

### 3.2 Teste de carga máxima e protocolo de exercício resistido

A carga máxima de esforço foi determinada conforme previamente descrito por Sanches et al. (2014). O protocolo consistiu na utilização de escada adaptada para roedores com 54 degraus verticais (espaçamento de 0,5 cm entre os degraus e 80° de inclinação).

Os animais passaram por duas fases distintas: fase de adaptação e fase de determinação da carga máxima. Na fase de adaptação, os animais realizarão três subidas em direção a caixa escura (20 x 20 x 20 cm) plotada no topo da escada, partindo de três pontos diferentes da escada: parte superior, média e inferior. Proceder-se com repouso de dois minutos entre cada subida. As ratas repetiram o procedimento por três dias consecutivos. A determinação da carga máxima foi realizada após pesagem dos animais, com as cargas (pesos de pesca) fixadas na porção proximal da cauda. As ratas iniciaram o teste transportando cargas correspondente a 75% do peso corpóreo. Completada a

subida e, após o repouso de dois minutos na caixa escura, o procedimento foi repetido com acréscimo de 15% do peso corporal até que o animal seja inapto a completar a subida até o topo da escada. A carga obtida na última subida completada foi definida como a carga máxima.

O protocolo de exercício resistido foi aplicado 72 horas após o teste de carga máxima. As ratas realizaram única sessão de exercício resistido, contemplando quatro subidas, com intervalos de 2 minutos de repouso entre as subidas (Figura 2).



**Figura 2.** Imagem ilustrativa da fase adaptativa do protocolo experimental.

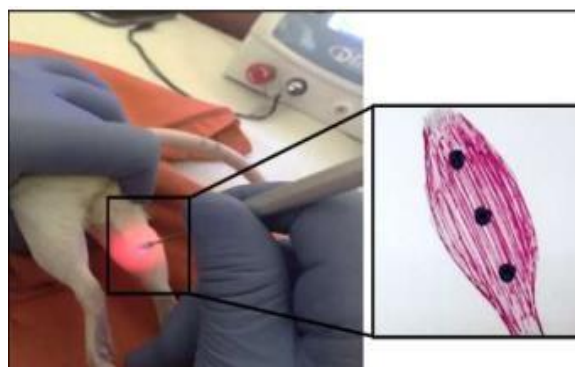
### **3.3 Parâmetros de irradiação com LBI**

O equipamento DMC Thera Laser (São Carlos, SP, Brasil) foi empregado nas irradiações conforme parâmetros ilustrados na Tabela 1. Pautada em nossa experiência prévia (de Oliveira et al., 2018a), 4 J de energia foi postulada como dose predita para gerar efeitos antioxidantes evidentes. Para caracterizar a possível influência da dose de energia, outros dois grupos de animais compuseram o estudo - ratos submetidos ao dobro (8 J) e triplo da dose (12 J) predita.

O LBI foi aplicado transcutaneamente em três pontos distintos do músculo gastrocnêmio. As irradiações foram realizadas por contato direto da ponteira na pele dos dois membros inferiores dos animais, totalizando seis pontos (Figura 3).

**Tabela 1.** Parâmetros de irradiação

Grupos experimentais	Comprimento de onda (nm)	Potência de saída (mW)	Área do feixe (cm <sup>2</sup> )	Densidade de potência (W/cm <sup>2</sup> )	Energia por ponto irradiado (J)	Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	Tempo de exposição (s)
Ctr	---	---	---	---	---	---	40
RTNI	---	---	---	---	---	---	80
4 J	830	100	0,028	3,57	4	142,8	40
8 J	830	100	0,028	3,57	8	285,6	80
12 J	830	100	0,028	3,57	12	428,4	120



**Figura 3.** Pontos de aplicação do LBI no músculo gastrocnêmio (Oliveira, 2016).

### 3.4 Desempenho físico

O trabalho e potência musculares foram calculados por meio do registro da carga, número de repetições, distância percorrida na escada e tempo despendido em cada subida durante a sessão treinamento (Ferraresi *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2018). O trabalho muscular (J) foi obtido com a equação da energia potencial gravitacional " $EP_g = mgh$ ", onde: " $m$ ", representa a carga (Kg) adicionada ao animal somada ao peso corporal (Kg); " $g$ ", representa aceleração devido à gravidade; " $h$ ", distância percorrida na escada (m). A potência muscular (mW) foi calculada por meio dos resultados de trabalho muscular e tempo despendido em cada subida durante a sessão treinamento (" $J/s$ "): " $J$ ", representa o trabalho muscular realizado; " $s$ ", representa o tempo em segundos.

### 3.5 Coleta de material biológico

Os animais foram eutanasiados com superdosagem de Pentobarbital sódico (180 mg/kg; *i.p.*) associado a lidocaína (10 mg/mL) imediatamente após o exercício e, em período correspondente para o grupo Ctr. O músculo gastrocnêmio da pata direita foi retirado e conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até processamento.

### 3.6 Estresse oxidativo

#### 3.6.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Amostras de 40 mg de gastrocnêmio foram homogeneizadas em PBS por quatro minutos e o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm em temperatura de 0 e  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem de TBARS com quite de ensaio colorimétrico (Cayman Chemical, MI, EUA; código: 10009055). Os ensaios foram conduzidos conforme orientação do fabricante.

#### 3.6.2 Mensuração do 4-hidroxinonenal (4-HNE)

O 4-HNE é um aldeído insaturado, produto da degradação peroxidativa de ácidos graxos ômega 6, habitualmente utilizado como marcador de dano oxidativo

(Zhong & Yin, 2015). A detecção e quantificação tecidual foram realizadas por Western blot, como descrito a seguir.

### 3.6.3 Oxidação proteica

A concentração de proteínas oxidadas foi analisada por Western blot com quite da Abcam (código: ab178020, Abcam, Cambridge, MA, EUA) em homogenatos contendo 10 µg de proteína. As amostras foram preparadas conforme orientação do fabricante e previamente descrito (de Oliveira *et al.*, 2018a).

### 3.6.4 Western blot

Amostras de gastrocnêmio (~ 50 mg) foram incubadas em 500 µL de tampão de lise SDS (Tris-HCl 0,05 M; SDS 0,5%; DTT 1mM; pH 8.0), contendo coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A mistura foi centrifugada a 1500 xg por 10 min e o sobrenadante foi coletado. Realizada dosagem da quantidade de proteína total pelo método de Bradford, cerca de 30 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%, BioRad gel, EUA). Após separação, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-P, Amersham Biosciences; Piscataway, NJ, EUA) e a eficiência da transferência e a igualdade da carga de proteínas foram apuradas com Ponceau S. As membranas foram bloqueadas em TBST (Tris-base 50mM; NaCl 1,5M; Tween 20 0,1%; pH 7.4) contendo leite em pó desnatado (5%). As proteínas transferidas foram incubadas a 4°C (*overnight*) com anticorpo primário 4-HNE (1:1000, ab46545 (Abcam, Cambridge, MA, EUA) ou reagente padrão que consta no quite de oxidação proteica da Abcam (código: ab178020; Abcam, Cambridge, MA, EUA). Em seguida, as membranas foram lavadas 5 vezes (5 min cada lavagem) em tampão TBST e, então, incubadas por 60 min em T.A. em anticorpo secundário anti-coelho (diluição de 1:2000). A seguir, as membranas foram novamente lavadas com TBST (5 vezes; 5 min cada lavagem) e expostas a reagente de quimiluminescência ECL (Biorad, Hercules, CA, EUA). Marcadores de peso molecular (Biorad) foram usados para identificar as proteínas. A expressão proteica foi determinada após digitalização das membranas em fotodocumentador (Amersham Images 600, GE, Alemanha) e a densidade óptica das proteínas foi analisada com o software próprio do aparelho.

### 3.6.5 Atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)

Cerca de 50 mg de gastrocnêmio foi homogeneizado em tampão fosfato a 0.1 M (pH 7,4) e, em seguida, centrifugado por 15 min a 800 xg e 13400 xg, respectivamente, (de Oliveira et al., 2018) para coleta do sobrenadante. Para atividade da CAT, adicionou-se 1 mL de meio de reação (90% peróxido de hidrogênio a 10 mM e 10% tampão fosfato a 50 mM) e 40 µL de amostra em cubeta mantida a 30°C. A seguir, realizou-se 9 leituras (duração total de 5 min) da cubeta em comprimento de onda de 240 nm.

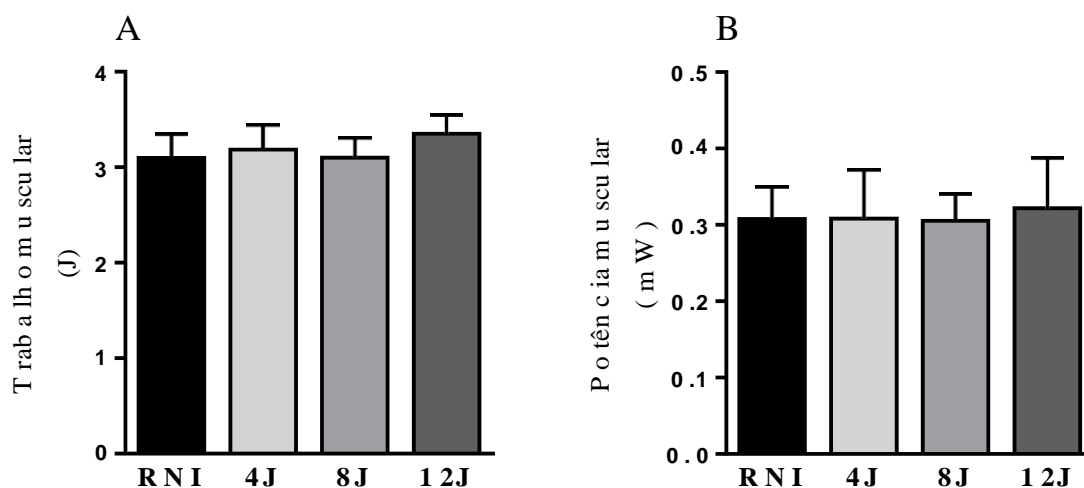
Os ensaios da atividade da SOD foram conduzidos em placa de 96 poços. Para tal, cada poço da placa aquecida a 25°C foi preenchido com 25 µL de amostra, 200 µL de meio de reação (0,0015 g de cloreto de tetrazólio azul e 0,0042 g de βNADH em 15 mL de tampão fosfato a 50 mM + EDTA a 0,1 mM) e 25 µL de metossulfato de fenazina (0,0010 g em 50 mL de água deionizada). A seguir, realizou-se 11 leituras (duração total de 5 min) da placa em comprimento de onda de 560 nm. As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, EUA). Os dados de CAT e SOD foram corrigidos pela concentração de proteína total dosada pelo método de Bradford.

### 3.7 Análise estatística

As análises foram realizadas com o programa *Graph Pad Prism*, versão 6.01 (San Diego, CA, EUA). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) e o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para analisar a distribuição Gaussiana. A comparação dos resultados entre os diferentes grupos foi realizada com ANOVA uma via ou Kruskal-Wallis (*post hoc*: Newman-Keuls para dados paramétricos ou Dunn para dados não paramétricos). O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ .

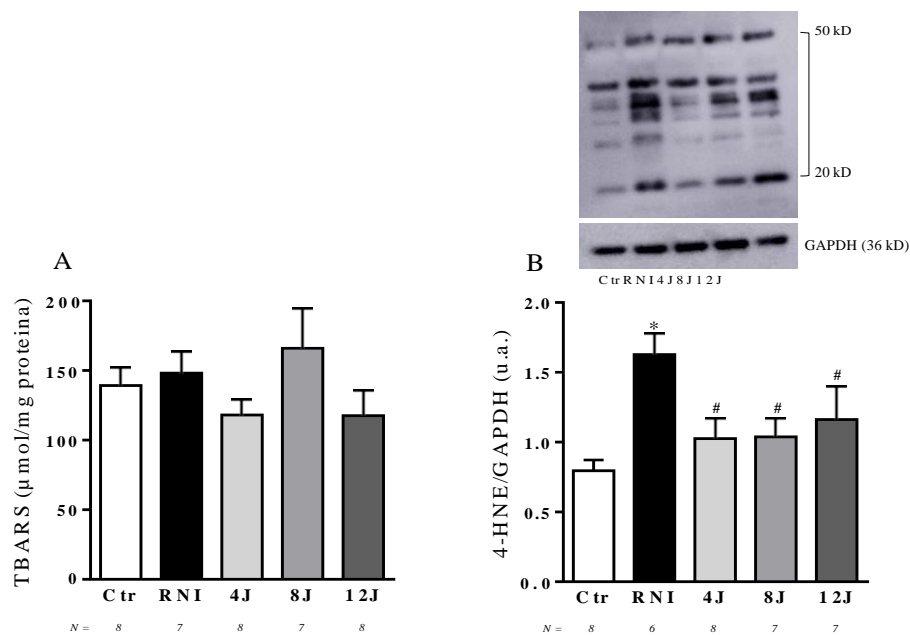
## 4. RESULTADOS

A Figura 4 ilustra os dados referentes ao desempenho físico dos animais, em que os resultados indicam que não houve influência significativa das diferentes doses de irradiação com LBI no trabalho e potência musculares.



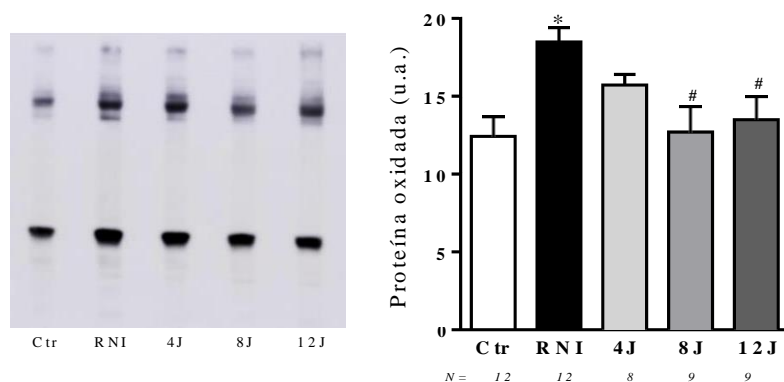
**Figura 4.** Testes de desempenho físico durante o exercício resistido em animais não irradiados (grupo RNI) e submetidos previamente a diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). *Painel A:* trabalho muscular. *Painel B:* potência muscular. Tamanho amostral de 10 animais por grupo.

A análise da lipoperoxidação no músculo gastrocnêmio foi conduzida por duas técnicas, dosagem de malonaldeído (MDA) via ensaio de TBARS e expressão proteica do 4-HNE por Western blot. Como ilustrado na Figura 5A, não houve diferenças significativas entre os grupos para a concentração muscular de MDA. Todavia, a expressão de 4-HNE foi significativamente maior em músculos de ratos submetidos ao exercício resistido, circunstância que foi abolida com a aplicação prévia do LBI (Figura 5B). Nota-se, ainda, que a repercussão positiva do LBI ocorreu independentemente da dose de energia aplicada.



**Figura 5.** Marcadores de lipoperoxidação muscular em ratos não exercitados (Ctr) e submetidos ao exercício resistido sem (grupo RNI) ou com aplicação prévia de diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). *Painel A:* TBARS. *Painel B:* 4-HNE. O tamanho amostral para cada grupo é descrito abaixo das respectivas barras. \* $p < 0,01$  vs. Ctr; # $p < 0,01$  vs. RNI.

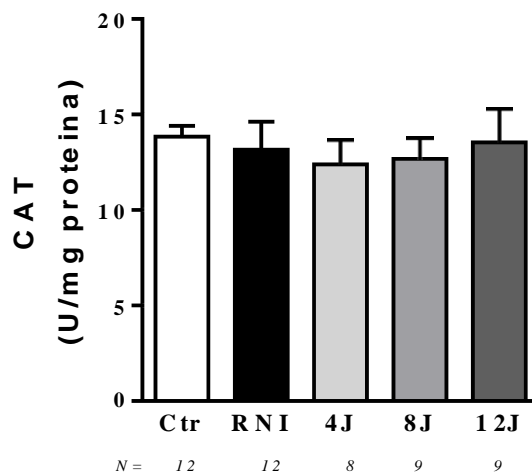
Dados representativos dos ensaios para determinação da oxidação proteica são ilustrados na Figura 6. Nota-se que o exercício resistido aumentou o conteúdo de proteínas oxidadas e que os animais submetidos à diversas irradiações exibiram valores similares ao do grupo Ctr. Todavia, ratos submetidos as doses de 8 e 12 joules apresentaram valores de oxidação proteica significativamente inferiores à do grupo RNI.



**Figura 6.** Conteúdo de proteína oxidada muscular em ratos não exercitados (Ctr) e submetidos ao exercício resistido sem (grupo RNI) ou com aplicação prévia de diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). O tamanho amostral para cada grupo é descrito abaixo das respectivas barras. \* $p < 0,01$  vs. Ctr; # $p < 0,001$  vs. RNI.

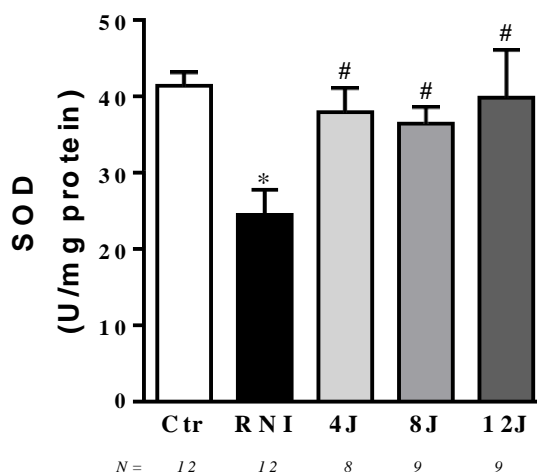


A Figura 7 ilustra os dados referentes a atividade muscular da enzima catalase (CAT), em que os resultados demonstraram que não houve influência significativa das diferentes doses de irradiação com LBI na atividade da enzima CAT.



**Figura 7.** Atividade muscular da enzima catalase (CAT) em ratas não exercitadas (Ctr) e submetidas ao exercício resistido sem (grupo RNI) ou com aplicação prévia de diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). O tamanho amostral para cada grupo é descrito abaixo das respectivas barras.

A Figura 8 ilustra os dados representativos da atividade muscular da enzima superóxido dismutase (SOD). Nota-se que o exercício resistido reduziu a atividade enzimática da SOD e que os animais submetidos à diversas irradiações exibiram valores similares ao do grupo Ctr. Todavia, ratas submetidas as diferentes doses de 4, 8 e 12 joules apresentaram valores de atividade enzimática de SOD significativamente maiores à do grupo RNI.



**Figura 8.** Atividade muscular da enzima superóxido dismutase (SOD) em ratas não exercitadas (Ctr) e submetidas ao exercício resistido sem (grupo RNI) ou com aplicação prévia de diferentes doses de LBI (4J, 8J e 12J, respectivamente). O tamanho amostral para cada grupo é descrito abaixo das respectivas barras. \* $p < 0,01$  vs. Ctr; # $p < 0,05$  vs. RNI.

## 5. DISCUSSÃO

É bem conhecido que o exercício de alta intensidade induz alterações profundas na homeostasia muscular esquelética, incluindo inflamação, necrose e estresse oxidativo. Dentre as alternativas disponíveis para contrapor essas ações, a aplicação de LBI surge como alternativa promissora. Nesse cenário, a maioria dos estudos analisou o papel do LBI na prevenção da necrose e inflamação musculares induzidas pelo exercício (Amadio *et al.*, 2015; De Marchi *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2018b), com poucos estudos estruturados para determinar sua ação antioxidante. Inerente a essa questão, parcela substancial dos dados provém de estudos que analisaram os efeitos da fotobiomodulação no aumento do estresse oxidativo induzido por exercícios aeróbicos de alta intensidade (De March *et al.*, 2012; De March *et al.*, 2018; Frigero *et al.*, 2018). No entanto, o papel da fotobiomodulação no estresse oxidativo muscular despertado pelo exercício resistido (ER) foi pouco explorado. Portanto, nós hipotetizamos que a irradiação com LBI poderia atenuar o aumento do estresse oxidativo induzido por ER. Além disso, também avaliamos se a dose de irradiação com LBI poderia determinar os efeitos antioxidantes.

Nossos resultados corroboram com estudos anteriores nos quais a aplicação do LBI antes do exercício não afetou o desempenho físico. Baroni *et al.* (2010) não observaram aumento no pico de torque excêntrico em sujeitos submetidos a LBI previamente a realização das contrações máximas dos extensores do joelho. Da mesma forma, efeito nulo do LBI no desempenho físico também foi reportado por nós em outros estudos com roedores, utilizando o trabalho muscular, a potência muscular e a velocidade de subida como indicadores de desempenho (de Oliveira *et al.*, 2018a; de Oliveira *et al.*, 2018b).

Nossos dados ilustram que a expressão de 4-HNE no grupo Ctr é similar a de todos os grupos irradiados, indicando que a fotobiomodulação promoveu inibição do aumento na lipoperoxidação muscular esquelética. Estes resultados estão de acordo com nossos achados anteriores para uma dose de irradiação de 4 joules (de Oliveira *et al.*, 2018a). No entanto, aqui determinamos a ação de duas outras doses de irradiação (isto é, 8 e 12 joules), em que observamos efeito semelhante sobre a lipoperoxidação. Curiosamente, enquanto o teor de 4-HNE foi significativamente aumentado nos animais exercitados não irradiados, não houve alterações significativas nas dosagens de TBARS entres os grupos experimentais. Esses achados não são claros, mas podem estar

associados ao método de mensuração. Por exemplo, componentes como lipídios oxidados, aldeídos saturados e insaturados, sacarose e ureia podem interferir com o ensaio de TBARS, o que resulta em mensuração não confiável dos níveis de malondialdeído (Dasgupta & Klein, 2014). Além disso, diferenças entre os achados de TBARS e 4-HNE podem ser explicadas pela estabilidade não singular destes aldeídos ao longo do tempo, o que também dificulta a análise da peroxidação lipídica. Assim, os hidroperóxidos são instáveis e a oxidação de um lipídio pode ocorrer sem acúmulo de hidroperóxidos (Antolovich *et al.*, 2002). Portanto, mudanças na decomposição do malondialdeído podem alterar a quantidade gerada sem menor taxa de lipoperoxidação nos ratos RNI, como visto no ensaio de TBARS.

Como descrevemos previamente (de Oliveira *et al.*, 2018a), houve aumento significativo na concentração total de proteína oxidada após ER, e a irradiação com LBI na dose de 4 joules não alterou a imunomarcagem. Porém, nas doses de 8 e 12 joules, o LBI normalizou o nível de proteína oxidada para valores semelhantes ao do grupo Ctr. O impacto destes achados na homeostase muscular pós-RE deve ser determinado. É conhecido que, ao longo do tempo, o acúmulo de proteínas oxidadas desperta estresse oxidativo, desestabilização da membrana lisossômica, liberação de proteases, permeabilização da membrana mitocondrial e apoptose (Dunlop *et al.*, 2009).

Para analisar os efeitos da fotobiomodulação no perfil antioxidante muscular, nós avaliamos a atividade enzimática da SOD e CAT. Essas enzimas atuam para evitar o aumento de radicais livres e seus os efeitos adversos. Sendo assim, quando há excesso de produção de radicais livres, o estresse oxidativo tem efeitos deletérios sobre a integridade estrutural e funcional das células e tecidos (Kurutas, 2016). Enzimas como CAT e SOD são componentes críticos da resposta antioxidante e, na maior parte, são constitutivamente expressas (Kurutas, 2016). O CAT desempenha papel específico na metabolização do peróxido de hidrogênio, uma substância altamente tóxica para a célula. A enzima SOD catalisa a dismutação (reação redox de oxidação e redução) do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio.

Como demonstrado em nossos resultados, houve redução significativa na atividade enzimática da SOD no grupo RNI em comparação com o grupo Ctr. Os grupos irradiados com as três doses de energia apresentaram valores semelhantes ao do grupo Ctr. Em relação a atividade enzimática da CAT, não observamos diferença significantes entre os diferentes grupos experimentais. Esses resultados corroboram com os achados de De Oliveira *et al.* (2018), que demonstraram que o LBI modula a

capacidade antioxidante após o ER. Nesse sentido, os resultados experimentais do presente estudo sugerem que o LBI, quando aplicado previamente à sessão de ER, pode aumentar a proteção muscular contra o estresse oxidativo via manutenção da atividade da SOD.

Em conclusão, a irradiação com LBI modulou o estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a uma sessão de ER de alta intensidade. As diferentes doses de irradiação (4, 8 e 12 Joules) foram capazes de prevenir o aumento na lipoperoxidação. Todavia, doses maiores resultaram em normalização dos níveis de oxidação proteica. Além disso, os grupos irradiados apresentaram melhora na defesa antioxidante ligada à atividade enzimática da SOD. No geral, esses resultados indicam que a irradiação com LBI pode ser uma abordagem interessante para contrapor a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio durante RE.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIONI, A., FANTINI, C., DIMAURO, I., CAPOROSSI, D. Redox homeostasis in sport: do athletes really need antioxidant support? *Res Sports Med*, v. 27, n. 2, p. 147-165, 2019.

ASHTON, T. et al. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol* (1985), v. 87, n. 6, p. 2032-6, 1999.

ASSIS, L. et al. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg Med*, v. 44, n. 9, p. 726-35, 2012.

BARONI, B. M. et al. Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. *Eur J Appl Physiol*, v. 110, n. 4, p. 789-96, 2010.

BENITEZ-SILLERO, J. D. et al. Cardiorespiratory fitness and oxidative stress: effect of acute maximal aerobic exercise in children and adolescents. *J Sports Med Phys Fitness*, v. 51, n. 2, p. 204-10, 2011.

BENTLEY, D. J. et al. Acute and chronic effects of antioxidant supplementation on exercise performance. In: LAMPRECHT, M. (Ed.). *Antioxidants in Sport Nutrition*. Boca Raton (FL), 2015.

BESSA, A. L. et al. Exercise Intensity and Recovery: Biomarkers of Injury, Inflammation, and Oxidative Stress. *J Strength Cond Res*, v. 30, n. 2, p. 311-9, 2016.

BLOOMER, R. J., GOLDFARB, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol*, v. 29, n. 3, p. 245-63, 2004.

CRUZAT, V. F. et al. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev Bras Med Esporte*, v. 13, nº 5, p. 336-342, 2007

DA PALMA, R. K. et al. Resistance or aerobic training decreases blood pressure and improves cardiovascular autonomic control and oxidative stress in hypertensive menopausal rats. *J Appl Physiol* (1985), v. 121, n. 4, p.1032-8, 2016.

DE OLIVEIRA, H. A. repercussão do pré e pós-condicionamento muscular esquelético com laser de baixa intensidade em marcadores bioquímicos de recuperação em ratas submetidas a sessão de exercício resistido. 2016. 22p. Dissertação (Mestrado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde) - Universidade Nove de Julho, São Paulo-SP, 2016.

DE OLIVEIRA, H. A., et al. Photobiomodulation Leads to reduced oxidative stress in rats submitted to high-intensity resistive exercise. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2018, p. 1-9, 2018a.

DE OLIVEIRA, H. A., Protective effects of photobiomodulation against resistance exercise-induced muscle damage and inflammation in rats. *J Sports Sci*, v. 36, n. 20, p. 2349-2357, 2018b.

DEMINICE, R. et al. Blood and salivary oxidative stress biomarkers following an acute session of resistance exercise in humans. *Int J Sports Med*, v. 31, n. 9, p. 599-603, 2010.

FARAH, D. et al. Exercise training prevents cardiovascular derangements induced by fructose overload in developing rats. *PLoS One*, v. 11, n. 12, p. e0167291, 2016.

FERRARESI, C. et al. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. *J Biophotonics*, v. 8, n. 9, p. 740-54, 2016.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, v. 35, pt 5, p. 1147-50, 2007.

HANDY, D. E., LOSCALZO, J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*, v. 16, n. 11, p. 1323-67, 2012.

HUANG, C. C. et al. Protective effects of L-arginine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in young rat tissues. *Chin J Physiol*, v. 52, n. 5, p. 306-15, 2009.

HUDSON, M. B. et al. The effect of resistance exercise on humoral markers of oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, v. 40, n. 3, p. 542-8, 2008.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, v. 15, n.

71, p. 1-22, 2016.

LUNDBY, C., JACOBS, R. A. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Exp Physiol*, v. 101, n. 1, p. 17-22, 2016.

LEAL JUNIOR, E. C. et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci*, v. 24, n. 3, p. 425-31, 2009.

LIU, J. et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* (1985), v. 89, n. 1, p. 21-8, 2000.

MACARDLE, W. D., KATCH, F. I., KATCH, V. L. *Fisiologia do exercício - nutrição, energia e desempenho humano - 7ª Ed.* Guanabara Koogan, 2011.

MCBRIDE, J. M. et al. Effect of resistance exercise on free radical production. *Med Sci Sports Exerc*, v. 30, n. 1, p. 67-72, 1998.

NIKOLAIDIS, M. G. et al. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med*, v. 38, n. 7, p. 579-606, 2008.

NIKOLAIDIS, M. G. et al. Does vitamin C and E supplementation impair the favorable adaptations of regular exercise? *Oxid Med Cell Longev*, v. 2012, p. 707941, 2012.

OLIVEIRA, H. A. et al. Gold standard dose of low-level laser to reduce muscle damage and post resistance exercise inflammation (*submetido*). *Journal of Applied Physiology*, 2017.

PETRIZ, B. A., et al. The effects of acute and chronic exercise on skeletal muscle proteome. *J Cell Physiol*, v. 232, n. 2, p. 257-269, 2017.

PINGITORE, A. et al. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*, v. 7, n.7-8, 916-22, 2015.

QUINDRY, J. C. et al. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, v. 35, n. 7, p. 1139-45, 2003.

- RADAK, Z. et al. Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur J Clin Invest*, v. 33, n. 8, p. 726-30, 2003.
- RETAMOSO, L. T. et al. Increased xanthine oxidase-related ROS production and TRPV1 synthesis preceding DOMS post-eccentric exercise in rats. *Life Sci*, v. 152, p. 52-9, 2016.
- RIBEIRO, B. G. et al. 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*, v. 11, n. 4, p. e0153618, 2016.
- SEN, C. K. Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med*, v. 31, n. 13, p. 891-908, 2001.
- SILVA, A. A. et al. Pre-exercise low-level laser therapy improves performance and levels of oxidative stress markers in mdx mice subjected to muscle fatigue by high-intensity exercise. *Lasers Med Sci*, v. 30, n. 6, p. 1719-27, 2015.
- SJODIN, B., HELLSTEN WESTING, Y. Changes in plasma concentration of hypoxanthine and uric acid in man with short-distance running at various intensities. *Int J Sports Med*, v. 11, n. 6, p. 493-5, 1990.
- SLATTERY, K., BENTLEY, D., COUTTS, A. J. The role of oxidative, inflammatory and neuroendocrinological systems during exercise stress in athletes: implications of antioxidant supplementation on physiological adaptation during intensified physical training. *Sports Med*, v. 45, n. 4, p. 453-71, 2015.
- SUNEMI, S.M., SILVA, A.F., ANTONIO, E.L., TUCCI, P.J.F., SERRA, A.J. Photobiomodulation: newly discovered actions in resistance exercise. *Reactive Oxygen Species (Apex)*, v. 7, n. 21, p. 1-6, 2019
- URSO, M. L., CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.



YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, v. 74, n. 1, p. 139-62, 1994.

ZHONG, H., YIN, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biol*, v. 4, p. 193-9, 2015.

**ANEXO****ANEXO 1: Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

**CERTIFICADO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Certificado que o projeto intitulado **ESTUDO DO PAPEL DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO EXERCÍCIO RESISTIDO EM RATOS**, protocolo nº AN008.2017, sob a responsabilidade de **ANDREY JORGE SERRA** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade Nove de Julho em reunião de 22/08/2017.

Vigência do Projeto: 01/10/2017 a 20/12/2017

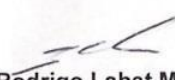
Espécie/linhagem: Rato Heterogênico

Nº de animais: 80

Peso/Idade: 250g / 10 semanas

Sexo: fêmea

Origem: UNINOVE

  
**Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos**

Coordenação - Comissão de Ética no Uso de Experimentação Animal - CEUA

**ANEXO 2:** Artigo publicado na Revista *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Hindawi  
Oxidative Medicine and Cellular Longevity  
Volume 2017, Article ID 5273403, 8 pages  
<https://doi.org/10.1155/2017/5273403>

*Review Article***Effects of Photobiomodulation Therapy on Oxidative Stress in Muscle Injury Animal Models: A Systematic Review**

**Solange Almeida dos Santos,<sup>1</sup> Andrey Jorge Serra,<sup>2</sup> Tatiane Garcia Stancker,<sup>1</sup>  
Maira Cecília Brandão Simões,<sup>1</sup> Marcia Ataíze dos Santos Vieira,<sup>1</sup>  
Ernesto Cesar Leal-Junior,<sup>1</sup> Marko Prokic,<sup>3</sup> Andrea Vasconsuelo,<sup>4</sup> Simone Silva Santos,<sup>2</sup> and  
Paulo de Tarso Camillo de Carvalho<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate Program in Biophotonics, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Department of Physiology, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia

<sup>4</sup>Department of Biology, Biochemistry and Pharmacy, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670, 8000 Bahia Blanca, Argentina

Correspondence should be addressed to Paulo de Tarso Camillo de Carvalho; [ptpaulo@terra.com.br](mailto:ptpaulo@terra.com.br)

Received 13 April 2017; Accepted 4 July 2017; Published 17 September 2017

Academic Editor: Valentina Pallottini

Copyright © 2017 Solange Almeida dos Santos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This systematic review was performed to identify the role of photobiomodulation therapy on experimental muscle injury models linked to induce oxidative stress. EMBASE, PubMed, and CINAHL were searched for studies published from January 2006 to January 2016 in the areas of laser and oxidative stress. Any animal model using photobiomodulation therapy to modulate oxidative stress was included in analysis. Eight studies were selected from 68 original articles targeted on laser irradiation and oxidative stress. Articles were critically assessed by two independent raters with a structured tool for rating the research quality. Although the small number of studies limits conclusions, the current literature indicates that photobiomodulation therapy can be an effective short-term approach to reduce oxidative stress markers (e.g., thiobarbituric acid-reactive) and to increase antioxidant substances (e.g., catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase). However, there is a nonuniformity in the terminology used to describe the parameters and dose for low-level laser treatment.

ANEXO 3: Artigo submetido à Revista *Journal of Sports Sciences*.

Andrey Serra &lt;andreyserra@gmail.com&gt;

**Submission Confirmation for Dose-dependent low-level laser therapy effect on muscle oxidative stress in rats subjected to high-intensity resistance exercise**

1 mensagem

Journal of Sports Sciences &lt;em@editorialmanager.com&gt;

24 de abril de 2019 16:20

Responder a: Journal of Sports Sciences &lt;rjsp-peerreview@journals.tandf.co.uk&gt;

Para: Andrey Jorge Serra &lt;andreyserra@gmail.com&gt;

Apr 24, 2019

Dear Andrey

Your submission entitled "Dose-dependent low-level laser therapy effect on muscle oxidative stress in rats subjected to high-intensity resistance exercise" has been received by journal Journal of Sports Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://rjsp.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Sports Sciences

**Journal of Sports Sciences**  
**Dose-dependent low-level laser therapy effect on muscle oxidative stress in rats subjected to high-intensity resistance exercise**  
 --Manuscript Draft--

<b>Full Title:</b>	Dose-dependent low-level laser therapy effect on muscle oxidative stress in rats subjected to high-intensity resistance exercise
<b>Manuscript Number:</b>	RJSP-2019-0616
<b>Article Type:</b>	Original Manuscript
<b>Keywords:</b>	Oxidative stress; Photobiomodulation; Resistance exercise; Skeletal muscle
<b>Abstract:</b>	We examined whether low-level laser therapy (LLLT) prior to a session of resistance exercise (RE) could attenuate muscle oxidative stress and to evaluate a possible dose-dependent effect. Female Wistar rats were assigned to non-LLLT (Ctr: non-exercised control; RNI: RE) and LLLT groups (energy doses: 4J, 8J, and 12J, respectively) submitted to RE. An 830-nm DMC Lase Photon III was used to irradiate their hind legs, which irradiations were applied to the gastrocnemius muscle at the distal, medial, and proximal points. RE consisted of four maximum load climbs. Prior LLLT did not induce muscle work and power improvement, but exposure to the three doses of energy resulted in prevention of increased lipoperoxidation. The prevention of increased protein oxidation was reported only for rats receiving 8 and 12 joules of energy. RE and LLLT did not change catalase muscle activity. However, RE resulted in a lower superoxide dismutase activity, and it was reversed when the LLLT was applied independent of the energy dose. These data indicate that LLLT prior to RE session can prevent muscle oxidative stress. We attempted to determine an ideal LLLT dose for suitable results, wherein 8 and 12 joules irradiation exposure showed a significant protective role.
<b>Order of Authors:</b>	Simone Santos Helenita Antonia de Oliveira Ednei Luiz Antonio Ighor Luiz Azevedo Teixeira Barbara Sampaio Dias Martins Mansano Flávio André Silva Paulo Tarso Camillo de Carvalho Paulo José Ferreira Tucci Andrey Jorge Serra, Ph.D.