

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO
Simone Adriana Guaraldo

**Análise dos Efeitos do Laser de Baixa Potência Relacionados ao Estresse Oxidativo de
Ratos Idosos Submetidos ao Treinamento Aeróbio**

São Paulo – SP

2014

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

Simone Adriana Guaraldo

**Análise dos Efeitos do Laser de Baixa Potência Relacionados ao Estresse Oxidativo de
Ratos Idosos Submetidos ao Treinamento Aeróbio**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof^o. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho

São Paulo – SP

2014

Guaraldo, Simone Adriana.

Análise dos Efeitos do Laser de Baixa Potência Relacionados ao Estresse Oxidativo de Ratos Idosos Submetidos ao Treinamento Aeróbio. / Simone Adriana Guaraldo. 2014.

66 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo Carvalho.

1. *Laser de baixa potência. 2. Exercício aeróbio. 3. Estresse oxidativo.*

I. *Carvalho, Paulo de Tarso Camillo.*

II. *Título*

CDU 615.8

São Paulo, 18 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

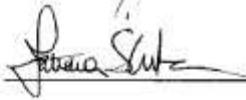
Aluno(a): SIMONE ADRIANA GUARALDO

Título da Dissertação: "Análise dos efeitos do laser de baixa potência sobre o estresse oxidativo de ratos e performance física de ratos idosos submetidos ao treinamento aeróbio"

Presidente: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILO DE CARVALHO



Membro PROFA. DRA. TATIANA DE SOUZA DA CUNHA UCHIYAMA



Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR



DEDICATÓRIA

**À Deus, minha família, amigos, colegas de
trabalho e orientador pelo apoio, força,
incentivo, companheirismo, paciência e amizade.
Sem eles nada disso seria possível.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos para que pudesse alcançar mais esse sonho.

A meu marido Sidney e meus filhos Juan e Sabrina, por toda a paciência, incentivo e amor durante todos os momentos. Sem eles sou quase nada. Aos meus pais Leila e Sérgio e meus irmãos, sobrinhos e familiares, por tanto incentivo, amor e colaboração.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof^o. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho por sua paciência, dedicação, atenção e carinho durante esses dois anos de trabalho, onde aprendi muito através de seus conhecimentos. Tenho muito orgulho de ser orientanda desse grande profissional.

Não posso deixar de lembrar da companheira de pesquisas Eliane M. Amadio e os colegas da Universidade Federal Paulistana, Ednei Luis Antonio, Flavio Silva, Leslie Andrews Portes, Prof^o Dr. Paulo José Ferreira Tucci, José A Silva Junior. Agradeço ainda aos professores Prof^o. Dr. Andrey Jorge Serra e Prof^o. Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal Junior pela colaboração e incentivo. Agradeço ainda a todos os professores e colegas que fizeram parte dessa jornada.

Meu último agradecimento vai à instituição Uninove, que abriu suas portas para que pudesse concretizar um sonho de longa data. Essa instituição é diferenciada e tem uma filosofia de crença na educação. Eu os admiro e agradeço por tudo.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar se a terapia com laser de baixa intensidade, usada em conjunto com o treinamento aeróbio, interfere com o estresse oxidativo, influenciando assim o desempenho de ratos idosos submetidos a um treinamento de natação. **Materiais e Métodos:** Um total de 30 ratos *Wistar (norvegicos albinus)* foram utilizados para este estudo: 24 ratos idosos, e 6 ratos jovens. Os animais idosos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos designados da seguinte forma: Idosos-Controle; Idosos-Exercício; Idosos-Laser de baixa potência, grupo Idosos-Laser de baixa potência associado ao exercício e animais jovens-controles. A capacidade aeróbia ($VO_2 0.75 \text{ max}$) foi analisada antes e após o período de treinamento. Os grupos / Laser de baixa potência associado ao exercício e Idosos-Exercício foram treinados durante 6 semanas. O laser foi aplicado em 808 nm e 4 joules de energia para os grupos indicados em todo o treinamento. Os ratos foram sacrificados, e o tecido muscular recolhido para análise do índice de peroxidação lipídica (TBARS), glutatona (GSH), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). **Resultados:** diferenças estatisticamente significativas nos valores de $VO_2 0.75 \text{ max}$ foram observados para o idoso Laser associado exercício em relação ao grupo idoso controle ($p < 0,01$) e também na comparação grupo exercício ($p < 0,05$). Os resultados indicam que a atividade de enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona-peroxidase (GPx) foi superior e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a associação de laser e exercício quando comparado com o grupo de laser e grupo exercício. Também foi observado que os animais jovens apresentaram para a atividade de enzimas antioxidantes menores e valores estatisticamente significativos no grupo idoso. O laser de baixa potência associado exercício o grupo apenas com exercício e o grupo apenas laser também foram capazes de atenuar a concentração de TBARS com ($p > 0,05$). Conclusão: Os resultados sugerem que a terapia com laser, em conjugação com o treinamento aeróbio pode proporcionar uma abordagem terapêutica para a redução do *stress* oxidativo, bem como o aumento no $VO_2 0.75 \text{ max}$ alométrico, indicando juntamente com o aumento da velocidade média que melhorou o desempenho em animais idosos tratados com LBI associada com treinamento aeróbio por natação.

Palavras-chave: Laser de Baixa Potência; Exercício Aeróbio; Estresse Oxidativo, $VO_{2\text{max}}$ alométrica.

Abstract

Purpose: The aim of the present study was to determine whether low-level laser therapy (LLLT), when used in conjunction with aerobic training, interferes with the oxidative stress, thereby influencing the performance of old rats participating in swimming. **Materials and Methods:** A total of 30 Wistar rats (*norvegicos albinus*) were used for this study: 24 aged rats, and 6 young rats. The older animals were randomly divided into 4 groups designated as follows: Aged-Control, Aged-Exercise, Aged-LLLT, Aged-LLLT/Exercise group and. Young-Control animals. Aerobic capacity ($VO_2^{0.75max}$) was analyzed after and before the training period. The Aged-Exercise and Aged-LLLT/Exercise groups were trained for 6 weeks. LLLT laser was applied at 808 nm and 4 joules of energy to the indicated groups throughout training. The rats were euthanized, and muscle tissue were collected for analysis the index of lipid peroxidation (TBARS), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity. **Results:** Statistically significant differences in $VO_2^{0.75max}$ values were observed for the Aged-LLLT/Exercise group compared to the baseline older group ($p < 0.01$) and compared with LLLT and exercise group ($p < 0.05$). The results indicate that the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) was superior and statistically significant ($p < 0.05$) in the association of LLLT and exercise when compared to the LLLT group and group exercise. Was also observed that young animals presented for the activity of antioxidant enzymes smaller and statistically significant values the Aged group. The LLLT plus exercise and only the LLLT and training (exercise group) was also able to mitigate the concentration of TBARS with ($p > 0.05$). **Conclusion:** These results suggest that laser therapy in conjunction with aerobic training may provide a therapeutic approach for reducing oxidative stress, as well as the increase in $VO_2^{0.75max}$ allometric, indicating along with increasing speed media improved performance in aged animals treated with LLLT associated with aerobic training by swimming

Keywords: low-level laser, aerobic exercise, oxidative stress, VO_2max allometric.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

EROs	espécies reativas de oxigênio
VO _{2max}	consumo máximo de oxigênio
LBP	laser de baixa potência
ATP	adenosina trifosfato
SOD	superóxido dismutase
RL	radicais livres
O ₂ • ⁻	superóxido
NO	�xido nítrico
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
CAT	catalase
GPx	glutathiona peroxidase
Cu, Zn- SOD ou SOD1	isoenzimas da SOD citosólica
Mn-SOD ou SOD2	isoenzimas da SOD mitocondrial
GSH	glutathiona reduzida
vitamina E	alfa-tocoferol
vitamina A	beta-caroteno
vitamina C	ascorbato
Coenzima Q10	ubiquinona
MDA	malondialdeído
TBARS	�cido tiobarbitúrico
O ₂	molécula de oxigênio
ADP	Adenosina difosfato
XO	xantina-oxidase
PL	peroxida�o lipídica
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LDH	lactato desidrogenase
LDHA	piruvato redutase
nm	nan�metro

J	Joules
mW	miliwatt
CK	creatina quinase
s	segundos
RNA	ribonucleic acid - ácido ribonucleico
COX	ciclooxigenase
MDA	malondialdeído
He-Ne	hélio e neônio
AsGa	arseneto de gálio
GIC	Grupo idoso controle
GJC	Grupo jovem controle
GIL	Grupo Idoso laser
GIE	Grupo Idoso exercício
GLE	Grupo Idoso laser e exercício
VCO ₂	produção dióxido de carbono
VO ₂	consumo de oxigênio
CO ₂	dióxido de carbono
N ₂	nitrogênio
InGaAlP	Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio
cm	Centímetro
KH ₂ PO ₄	Hidrogenofosfato de Potássio
NaHPO ₄	Fosfato monossódico
2H ₂ O	Citrato De Sódio
rpm	rotações por minuto
pH	potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1 Introdução	1
2. Revisão Da Literatura	5
2.1 Envelhecimento	5
2.1.1 Envelhecimento e Estresse Oxidativo	6
2.1.2 Espécies Reativas de Oxigênio	7
2.1.3 Estresse Oxidativo	9
2.1.4 Estresse Oxidativo e Exercício Físico	10
2.2 Laser de Baixa Potência	12
2.2.1 Características Gerais	12
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Animais de Experimentação.....	19
4.2 Grupos Experimentais	19
4.3 Procedimentos Realizados	19
4.3.1 Capacidade aeróbia em esteira - consumo máximo de oxigênio (VO_{2max})	19
4.3.2 Procedimento de Treinamento	20
4.3.3 Aplicações do LBP	21
4.3.4 Eutanásia	21
4.3.5 Coleta dos Materiais	21
4.3.6 Biomarcadores de Estresse Oxidativo	21
4.3.7 Catalase (CAT)	22
4.3.8 Biomarcadores de Peroxidação de Lipídios: Concentração TBARS	22
4.4 Análise Estatística	23
5. RESULTADOS – Artigo submetido ao periódico: Lasers in Medical Science	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7. REFERENCIAS	55

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Introdução

Entende-se como envelhecimento o processo de mudanças pelo qual o organismo passa ao longo da vida. Este processo provoca alterações em sua estrutura biológica acarretadas pelo declínio no processo de renovação celular (FARAGE *et al.*, 2013).

Segundo Romano *et al.*, (2010), o envelhecimento é um estado fisiológico em que acontece o decréscimo progressiva das funções dos órgãos, é acompanhado do desenvolvimento de doenças relacionadas a idade.

Uma das explicações mais aceitas para o mecanismo de envelhecimento é a “Teoria dos Radicais Livres”, esta teoria defende a tese de que o envelhecimento e as doenças causadas por ele são relacionadas aos danos causados pelos radicais livres e a incapacidade do organismo de contrabalançá-los (GEMMA *et al.*, 2007).

Estudos asseveram que existe uma relação intrínseca entre atividade física, saúde, qualidade de vida e envelhecimento. É praticamente um consenso entre os profissionais da área da saúde que a atividade física é determinante no sucesso do processo do envelhecimento e auxiliam no tratamento e prevenção das doenças que acometem esta faixa etária (MATSUDO, *et al.* 2001; NASCIMENTO, *et al.*, 2014; CALLAHAN; KENT-BRAUN 2011; CIPRIANI *et al.* 2010; ROSA *et al.*, 2008).

O exercício físico aeróbico de baixo impacto tem sido cada vez mais recomendado para os idosos como um modo eficaz e seguro de melhorar a força muscular e a capacidade funcional. A atividade física nos idosos proporciona resultados positivos como aumento do fluxo sanguíneo, da massa muscular e da força de velocidade (MCARDLE; VASILAKI; JACKSON, 2008; CALLAHAN; KENT-BRAUN 2011).

Existem diferentes tipos de exercícios físicos que promovem adaptações bioquímicas e estruturais no tecido muscular. (WESTERBLAD; BRUTON; KATZ, 2010; TONKONOJI *et al.*, 2000). Exercícios de força e de alta intensidade promovem recrutamento maior de energia do metabolismo anaeróbico levando ao desenvolvimento da força muscular. (LIU *et al.*, 2003; FRY, 2004). Exercícios de resistência ou de baixa intensidade promove um recrutamento maior de energia do metabolismo aeróbico e aumenta a resistência à fadiga muscular.

Exercícios de resistência aeróbia e de força são essenciais para um envelhecimento saudável. Os exercícios aeróbios melhoram a capacidade funcional; aumentam a capacidade cardíaca, prevenindo e reduzindo o risco de doenças cardiovasculares. Os exercícios de força melhoram a função muscular, reduzindo, sobretudo, a frequência de quedas. Ambos os exercícios contribuem para melhoras significativas na densidade óssea e redução do risco de desenvolver o diabetes mellitus tipo 2, além de reduzir a ansiedade e depressão. Entretanto, os benefícios do exercício desaparecem com o excesso e com a falta de treinamento. O exercício excessivo causa dano muscular provocado por radicais livres e induz uma elevação na atividade enzimática citosólica no plasma. (NELSON et al. 2007; VIÑA RIBES, 2001).

Existe evidência de que o aumento da produção de radicais livres desempenha um papel importante na ativação de respostas adaptativas no músculo esquelético. A produção de radicais livres é diferente no músculo de indivíduos idosos e jovens, a capacidade do músculo de indivíduos idosos para responder ao estresse é escassa. O equilíbrio entre a produção de pró-oxidante e a capacidade do organismo em elaborar uma resposta adaptativa bem sucedida é crucial para a capacidade dos músculos recuperar danos e as alterações do estado de redox, isso resulta no desenvolvimento de déficits funcionais que ocorrem nos músculos à medida que envelhecemos (MCARDLE , VASILAKI, JACKSON , 2002).

O desequilíbrio oxidante/antioxidante pode levar os ácidos graxos insaturados dos fosfolípidios das membranas celulares a sofrerem peroxidação (peroxidação lipídica), resultando em perda significativa da integridade da membrana. Tal ocorrência consiste em um dos principais efeitos dos danos oxidativos, levando à geração de aldeídos e consequências potencialmente nocivas, podendo a célula sofrer morte celular programada (apoptose) (VIEIRA JUNIOR, et al. 2013).

As mudanças relacionadas à idade nesse equilíbrio podem ser cruciais para o déficit funcional que se desenvolve durante o envelhecimento. A capacidade das células dos idosos de responder ao *stress* por aumento do teor de proteínas citoprotectores é severamente atenuada (MCARDLE; JACKSON, 2000).

O treinamento físico aeróbio pode contribuir para melhorar a tolerância tecidual ao *stress* oxidativo. O papel benéfico do treinamento físico aeróbio sobre a defesa antioxidante e atenuação do *stress* oxidativo. O treinamento físico aeróbio é capaz de promover aumento das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, além de contribuir para uma menor taxa de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria durante o exercício

submáximo realizado numa mesma intensidade relativa (% VO₂max.) (CHILDS et al., 2001; MASTALOUDIS et al., 2004; PINHO et al., 2006).

Estudos indicam haver uma correlação positiva e significativa entre o aumento do VO₂max e atividade de enzimas antioxidante e sugerem que a atividade aumentada destas enzimas pode ser um indicador de potencial de um nível de treinamento melhorado (MOFFARTS et al. 2004).

Pesquisadores têm utilizado o laser em baixa potência (LBP) para modelar essas mudanças metabólicas, buscando reduzir ou retardar a fadiga muscular e melhorar a performance (VIEIRA *et al.*, 2006; LOPES-MARTINS *et al.*, 2006).

Alguns dos principais efeitos fisiológicos atribuídos ao Laser de Baixa Potência (LBP) estão relacionados com o metabolismo. Foi observado em diferentes patologias, o aumento da microcirculação (TULLBERG et al. 2003), o aumento da síntese de ATP , estímulo da cadeia respiratória mitocondrial (SILVEIRA et al. 2009) e da função mitocondrial (XU et al. 2008). Também foi observado que a fototerapia promove a redução da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da atividade da creatina fosfoquinase, aumentando a produção de antioxidantes e proteínas de choque térmico (AVNI, et al, 2005; Rizzi et al 2006).

O LBP aumenta a atividade da enzima Sod (superóxido dismutase) e estimula a sua síntese pela célula, o que poderia explicar a diminuição dos danos oxidativos a lipídios e proteínas observados após a aplicação de LBP (LUBART *et al.* 2005; AVNI *et al* 2005; FILLIPINI *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009 ; APPLEROT et al. 2012).

De acordo com Basso *et al.*, (2012) o LBP reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que ocorre durante a fase aguda de lesão epitelial e muscular. Isso se deve principalmente por acelerar o processo inflamatório e assim diminui a exposição celular a ERO.

De Marchi *et al.* (2012), sugere que o uso do laser antes da execução do exercício pode diminuir a fadiga muscular aumentando o desempenho físico e o consumo máximo de oxigênio (VO₂max) além de diminuir o estresse oxidativo e lesões musculares.

Tendo em vista os problemas de saúde e a diminuição na qualidade de vida causada pelo envelhecimento; que a atividade física regular de baixa intensidade pode contribuir para minimizar os problemas de saúde associados ao envelhecimento; que estudos recentes têm demonstrado que a fototerapia com LBP pode melhorar a desempenho físico; justifica-se este trabalho que tem como objetivo verificar a ação do Laser de Baixa Potência na capacidade física

e estresse oxidativo no músculo gastrocnêmico em ratos idosos submetidos a treinamento aeróbio.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Envelhecimento

O envelhecimento é um processo natural do organismo e múltiplos fatores celulares estão envolvidos em seu mecanismo, os quais vêm sendo pesquisados nas últimas décadas (RUSS, LANZA, 2011).

De acordo com Cipriani *et al.* (2010) e Rosa *et al.*, (2008) a atividade física realizada pelos idosos é um relevante fator para a manutenção da aptidão funcional. Apesar do processo natural do envelhecimento e/ou fatores a ele integrados causarem prejuízos nas diferentes qualidades físicas, a prática regular de exercícios físicos parece amortizar os efeitos negativos do envelhecimento sobre as capacidades físicas, adiando as restrições à realização das atividades da vida diária e aumentando o período de vida ativa, independente e saudável de idosos.

Segundo Petrella *et al.*, (2008) e Gibson, Schultz, (1982), o músculo estriado esquelético exibe alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características morfológicas, metabólicas e funcionais, em resposta a estímulos específicos. Neste contexto, as adaptações fenotípicas musculares podem ocorrer em várias situações, como o envelhecimento, a imobilização, a microgravidade, a desnervação e o exercício/treinamento físico.

Durante toda a vida, e em particular durante o envelhecimento, os ajustes e/ou adaptações musculares para atender a demanda mecânica e metabólica do exercício/treinamento físico resultam em acentuadas modificações na expressão gênica e tradução de proteínas músculo específicas (SCHIAFFINO, REGGIANI, 1994; RAO, LUO, 1997).

2.1.1 Envelhecimento e Estresse Oxidativo

O envelhecimento é um estado fisiológico em que ocorre o declínio progressivo das funções dos órgãos, é acompanhado do desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade. As causas do envelhecimento permanecem desconhecidas, provavelmente estão ligadas a um processo multifatorial (ROMANO *et al.*, 2010).

Segundo Gemma *et al.*, (2007) uma das explicações mais plausíveis e aceitáveis para o mecanismo de envelhecimento é a “Teoria dos radicais livres”, que postula que o envelhecimento e as doenças causadas por esta são relacionadas aos danos causados pelos radicais livres e a incapacidade de contrabalanceá-los.

Em 1956 Harman propôs a "teoria dos radicais livres". Ele sugeriu que os radicais livres produzidos durante a respiração celular teriam efeitos deletérios sobre componentes de células e tecidos conjuntivos, causando danos cumulativos ao longo do tempo que, finalmente, resultaria no envelhecimento e morte. Ele especulou que os radicais livres são provavelmente produzidas por meio de reações que envolvem o oxigênio molecular catabolizado nas células pelas enzimas oxidativas e aumentada por metais residuais tais como ferro, cobalto e manganês.

Expandindo seus estudos no ano de 1972, Harman verificou a ação das mitocôndrias nos processos fisiológicos de envelhecimento. Propôs que as mitocôndrias geram uma quantidade significativa de energia celular e, através do consumo da maior parte do oxigênio intracelular, definem o tempo de vida. Cerca de 90% de oxigênio celular é consumido dentro da mitocôndria, principalmente na membrana interna, onde ocorre a fosforilação oxidativa. Desde o início da década de 1970, vários estudos têm surgido para dar suporte a esta teoria, e a teoria dos radicais livres do envelhecimento foi expandida para a teoria dos radicais livres mitocondrial do envelhecimento. A premissa da teoria dos radicais livres mitocondrial do envelhecimento é que as mitocôndrias são as produtoras e os alvos de espécies reativas oxidantes. De acordo com a teoria, ataques de estresse oxidativo mitocondrial, levam a maior dano oxidativo. Como consequência, as mitocôndrias danificadas progressivamente se tornam menos eficientes, perdendo a sua integridade funcional e liberando mais moléculas de oxigênio, aumentando o dano oxidativo para a mitocôndria, e culminando em um acúmulo de mitocôndrias disfuncionais com a idade (GEMMA *et al.*, 2007).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL, WHITEMAN, 2004).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (BARBOSA *et al.*, 2010).

2.1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) inclui os átomos e moléculas que possuem alta radioatividade e efeitos oxidantes e regulatórios, portanto, contempla tanto as espécies químicas *radicais livres* (RL), que são os átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, quanto as *não radicais livres*, uma definição para os átomos e moléculas que geram alta radioatividade sem apresentarem o desemparelhamento de elétrons (DRÖDGE, 2002; POWERS e JACKSON, 2008).

Os radicais livres primários mais relevantes na regulação biológica são o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o óxido nítrico (NO). O ânion superóxido produzido pelas células, por enzimas e de forma não-enzimática, pode ser liberado no espaço extracelular por canais sensíveis à voltagem mas muitos dos efeitos regulatórios ocorrem por ações de EROs quimicamente derivadas do superóxido (DRÖDGE, 2002; JACKSON, 2008; ALLEN, LAMB E WESTERLAB, 2008).

A alta produção destas espécies reativas é responsável por várias ações deletérias, tais como aumento de peroxidação lipídica, aumento na oxidação de proteínas e danos ao DNA podendo resultar em morte celular. As principais alterações estruturais e funcionais induzidas pelas EROs nos diferentes componentes orgânicos, assim como as suas consequentes repercussões na funcionalidade celular. Entre as diversas fontes de produção de EROs

reconhecidas, podemos destacar: a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial músculo esquelético; e auto-oxidação de catecolaminas (JAVESGHANI *et al.*, 2002; ZOPPI *et al.*, 2003; URSO e CLARKSON, 2003; McANULTY *et al.*, 2005).

Há, nos organismos vivos, substâncias que neutralizam as EROs – chamadas de antioxidantes - definidas como aquelas que são capazes de atrasar significativamente ou inibir a oxidação de um substrato. Essa definição inclui as substâncias presentes em baixas concentrações no organismo, mas com alta capacidade antioxidante como os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O grupo enzimático possui um número limitado de enzimas e são constituídas por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Estas enzimas constituem-se a defesa primária contra a geração de EROs durante o exercício e sua atividade é conhecida por aumentar em resposta ao exercício tanto nos estudos em animais quanto em humanos (POWERS, JI e LEEUWENBURGH, 1999; DRÖDGE, 2002; METIN *et al.*, 2003; POWERS e JACKSON, 2008).

As enzimas antioxidantes são importantes e desempenham papel complementar. De fato, as isoenzimas da SOD regulam a quantidade de superóxido presente nas células, mas promovem aumento na concentração intracelular de peróxido de hidrogênio. Em paralelo, as enzimas CAT e GPx degradam peróxido de hidrogênio e a glutathione peroxidase produzidos como subprodutos da ação lesiva de EROs sobre lipídios. Nos mamíferos, existem três isoenzimas da SOD, codificadas e reguladas de forma independente: a citosólica (Cu, Zn- SOD ou SOD1), a mitocondrial (Mn-SOD ou SOD2) e uma forma extracelular da Cu, Zn-SOD ou (SOD3), sendo que a CuZn-SOD- citosólica está presente em maior quantidade que a Mn-SOD- mitocondrial (SANKARAPANDI e ZWEIER, 1999).

O sistema antioxidante não enzimático inclui principalmente a glutathione reduzida (GSH), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (vitamina A), ascorbato (vitamina C), ubiquinona (Coenzima Q10) e cisteína); bem como contempla as substâncias que têm baixa atividade antioxidante, mas encontram-se em altas concentrações no organismo, como os aminoácidos livres, os peptídeos e as proteínas (SILVEIRA, 2004).

2.1.3 Estresse Oxidativo

O balanço entre as taxas de produção e de remoção das EROs determina sua concentração. Quando ambas as taxas estão equilibradas, as células e tecidos encontram-se em estado estável.

Se esse estado é rompido pelo aumento da produção de EROs sem a concomitante compensação dos antioxidantes, ou pela redução apenas da concentração de antioxidantes, são gerados a sinalização redox e o estado de ‘estresse oxidativo’. O quadro de estresse oxidativo, definido como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes” resulta em peroxidação lipídica, um dano que pode alterar a permeabilidade da barreira celular e comprometer a sua integridade. Para avaliação do estresse oxidativo são utilizados subprodutos provenientes da peroxidação lipídica. Um desses marcadores, comumente utilizado, é o malondialdeído (MDA), medido por sua reatividade ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRÖDGE, 2002; RAMEL, WAGNER e ELMADFA, 2004; LEKHI GUPTA e SINGH, 2007 ; POWERS e JACKSON, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Uma situação que pode alterar o estado redox, por causar um aumento da produção de EROs, é o exercício físico; embora esse resultado não tenha sido encontrado em alguns estudos (BENONI *et al.*, 1995; QUADILÁTERO *et al.*, 2010). Durante o exercício físico, o aumento da produção de superóxido pode ser o resultado de sua maior geração pela fibra muscular – o que pode ocorrer em diversos locais, como na mitocôndria, no retículo sarcoplasmático, nos túbulos transversos, no sarcolema e no citosol (VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2002; CHEVION *et al.*, 2003; CLOSE *et al.*, 2005; LEKHI, GUPTA e SINGH, 2007; ALLEN, LAMB e WESTERLAB, 2008; JACKSON, 2008; JACOBS, DONOVAN e ROBINSON, 2009; POWERS *et al.*, 2010).

Além da produção pela fibra muscular, é também considerada na literatura a geração de superóxido através da xantina oxidase, principalmente em situações em que há ocorrência de isquemia/reperfusão, pela ativação de leucócitos através das alterações hormonais, metabólicas e circulatórias promovidas pelo exercício e pelo aumento da concentração de lactato (COOPER *et al.*, 2007; SILVA, 2008; ALLEN, LAMB e WESTERLAB, 2008; BROOKS, 2009).

2.1.4 Estresse Oxidativo e Exercício Físico

Durante o exercício, fatores como intensidade e duração, bem como, o nível de treinamento dos participantes determinam o nível de estresse metabólico imposto pelo exercício. Na maioria dos casos, verifica-se que quanto maior é a intensidade do exercício, maior é a síntese de EROs. Indivíduos que se submetem a exercícios intensos e prolongados ou treinos exaustivos, ou ainda, que possuem frequência de treinamento muito elevada podem

suplantar a capacidade do sistema antioxidante endógeno em decorrência, promover graves lesões musculares, com consequente processo inflamatório local e estresse oxidativo (SCHNEIDER *et al.*, 2005; CRUZAT *et al* 2007).

Quando um estímulo como o exercício físico provoca uma elevada geração de EROs ou a diminuição do sistema de defesa ocorre um desequilíbrio entre a produção e a remoção o que caracteriza um desbalanço redox temporário, se este desbalanço for mais intenso e duradouro caracteriza-se um estresse oxidativo crônico (DROGE, 2002; URSO e CLARKSON, 2003; OLIVEIRA *et al* 2004).

O exercício físico de intensidade leve a moderada tem sido descrito como causador de um desbalanço redox temporário principalmente em indivíduos destreinados. Isto se deve principalmente ao aumento da taxa de consumo de oxigênio pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Considerando que durante o exercício intenso o consumo de O₂ intramuscular aumenta em aproximadamente 100 vezes e que 2 a 5 % do O₂ utilizado pelas mitocôndrias são convertidos em EROs, é razoável supor que a produção mitocondrial de superóxido em tais condições se encontre igualmente aumentada (MASTALLOUDIS *et al.*, 2001; URSO e CLARKSON, 2003; SILVEIRA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SCHNEIDER e OLIVEIRA 2004; VANCINI *et al.*, 2005; CRUZAT *et al.*, 2007; WISLOFF *et al* 2007).

Outros fatores que podem contribuir para a elevação da formação de EROs pelo exercício físico são: isquemia-reperusão muscular; auto-oxidação de catecolaminas; neutrófilos ativados no sítio inflamatório de músculos lesados. De acordo com o processo de isquemia-reperusão como meio de formação de EROs durante o exercício físico é mais relevante em situações em que o metabolismo anaeróbico predomina na obtenção de energia: contração muscular isométrica, treinamento de força, corridas de velocidade e exercício em ambiente hipóxico. Ou seja, existe a possibilidade de ocorrer formação elevada de EROs no organismo tanto no exercício físico de curta como no de longa duração. No processo isquêmico, o ADP é parcialmente convertido a hipoxantina e ácido úrico pela xantina-oxidase (XO) (JI,1999).

Nesse processo, a enzima xantina-desidrogenase predominante em condições basais é convertida por proteases citosólicas em xantina-oxidase (XO). Na forma de oxidase, a enzima converte hipoxantina a ácido úrico utilizando o O₂ como acceptor final de elétrons, aumentando-se a produção de superóxido. Embora esta seja uma via importante para a manutenção dos níveis de ATP durante o estado de elevada demanda metabólica, quando ativada há um grande aumento na produção de superóxido (SJODIN *et al.*, 1986).

Outra possibilidade é a redução do ferro pelo ácido ascórbico, com posterior formação de radical hidroxil. Existem evidências de que o lactato produzido durante o exercício de curta duração e alta intensidade pode favorecer a liberação de ferro de mioglobinas e favorecer a formação de radical hidroxil. Foi demonstrado que no exercício físico ou na contração muscular ocorre: aumento na formação de radical hidroxil; produção intracelular de superóxido e peróxido de hidrogênio com posterior difusão para o meio extracelular; diminuição na eficiência da contração muscular e precipitação da fadiga e; lesões oxidativas em lipídios, proteínas e DNA (POLIDORI *et al.*, 2000; SEN e PACKER, 2000).

Este desequilíbrio é responsável por várias ações deletérias em nosso organismo como peroxidação de lipídios, carbonilação de proteínas e danos ao DNA celular. Consequentemente, causando alterações funcionais das estruturas celulares, prejuízo das funções vitais e indução de apoptose em diversos tecidos e órgãos. O componente lipídico das membranas biológicas é especialmente vulnerável a oxidação e passa por um processo de peroxidação em cadeia (SUPINSKI, 1998; ZOPPI *et al.*, 2003; GRANOT e KOHEN, 2004).

O caminho da peroxidação lipídica (PL) é o mesmo no repouso e no exercício, entretanto, estudos têm demonstrado aumento na reação durante o exercício. Estudos realizados indicam que há um aumento na peroxidação lipídica tanto em exercícios aeróbicos quanto anaeróbicos. A indução da PL pelo exercício intenso conduz a problemas como inativação de enzimas da membrana celular, diminuição da efetividade do sistema imune e progressão de doenças crônicas degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares (VIITALA *et al.*, 2004).

O nível de PL também se mostrou aumentada após exercício aeróbio exaustivo e exercício resistido (com pesos), realizados de forma aguda (MASTALOUDIS *et al.*, 2001; MIYAZAKI *et al.*, 2001; METIN *et al.*, 2003; VIITALA *et al.*, 2004).

O exercício físico agudo induz ao aumento no consumo de oxigênio bem como nas demandas energéticas, induzindo ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que dependendo da sua concentração, reagem com estruturas celulares oxidando-as (ZOPPI *et al.*, 2003).

Liu *et al.* 2000, investigaram as respostas do estresse oxidativo frente ao exercício crônico e agudo em diversos órgãos como cérebro, rim, coração, fígado e músculos de ratos. Os resultados mostraram que o estresse oxidativo induzido pelas duas formas de exercício produziu respostas diferentes, as quais foram dependentes do tipo de tecido avaliado e de sua capacidade antioxidante.

2.2 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

2.2.1 Características Gerais

Albert Einstein em 1916 descreveu o princípio do Laser, quando postulou o fenômeno físico da emissão estimulada de fótons de um meio ativo excitado (KARU, 2004). Laser é um acrônimo Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation que quer dizer uma radiação de luz por emissão estimulada de radiação.

Segundo Chung et al. (2009) a ação do Laser de Baixa Potência (LBP) tem sido o objetivo de investigações desde 1960. O mecanismo de ação sobre os tecidos é atribuído à capacidade de energia da luz ser absorvida pelas células.

Para Pagès et al., (1999) e Tuby; Maltz; Oron, (2007), as energias depositadas pelo fóton nos tecidos biológicos podem provocar processos vibracionais, rotacionais e eletrônicos que prontamente se transforma em outro tipo de energia ou efeito biológico, o efeito bioelétrico impulsiona o aumento e a quantidade na produção de ATP produzida pela célula agindo diretamente na mobilidade iônica, dessa forma potencializa a bomba de sódio e potássio, mantendo com maior eficácia a diferença de potencial de ação intracelular e extracelular. O laser também pode exercer um efeito sobre os tecidos. A interação do laser com os tecidos biológicos é dependente do comprimento de onda, da densidade de energia e da potência do laser (HUANG *et al.*, 2009)

Os autores ALBERTINI (2002) e SAY, (2003) indicam que os componentes celulares podem absorver fótons fornecidos por meio da energia do laser de baixa potência (fotorreceptores) e ampliar a produção de ATP provendo energia para a célula, que por sua vez pode modular a resposta inflamatória.

Os elementos da cadeia respiratória são postulados como fotorreceptores primários, mormente o citocromo c oxidase. Quando as células são irradiadas com múltiplas faixas de luz, esta é absorvida pela cadeia respiratória. As primeiras ocorrências fotoquímicas e fotofísicas acontecem na mitocôndria de células eucariontes e na membrana citoplasmática (KARU, 1999).

A laserterapia pode provocar a fosforilação de proteínas quinases MAPK/ERK nas células, as quais estão associadas ao mecanismo de proliferação celular (STEIN *et al.*, 2005). Verifica-se um crescimento na produção de ATP e maior atividade da enzima fosfatase alcalina,

o que incrementa a proliferação celular, e ainda maior expressão de citocinas como interleucina 6, quando a célula é submetida à irradiação laser. De tal modo, foi sugerido que a irradiação laser tem um efeito terapêutico a mais por fomentar a produção citocinas, causando a comunicação intercelular, migração e proliferação, para auxiliar no processo de cicatrização tecidual (HAWKING-EVANS; ABRAHAMSE, 2006).

2.2.2 Exercício Físico e Laser em Baixa Potência

Estudiosos averiguaram os efeitos da LBP com 780nm sobre a fadiga muscular em ratos treinados por 30 dias usando uma carga ao limiar anaeróbico em uma esteira. Um único ponto em cada músculo tibial anterior, glúteo máximo, femoral e sóleo foram irradiados após cada treino. Os resultados indicaram uma maior inibição da atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH), principalmente a isoforma LDHA (piruvato redutase) (VIEIRA *et al.*, (2006).

De Almeida *et al.*, (2011) realizaram um estudo em que 30 ratos foram distribuídos em quatro grupos experimentais, um grupo foi destinado a grupo controle e quatro receberam diferentes e distintas doses: 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 J do de laser 904 nm com 15 mW de potência média. Os grupos 1,0 e 3,0 J evidenciaram melhoramento significativo no total de trabalho realizado em seis contrações tetânicas. O grupo 1,0 J apresentou o melhor resultado tendo melhor performance do músculo esquelético e reduzindo os danos pós-exercício.

Lopes-Martins *et al.*, (2006) e Leal Junior *et al.*, (2010) realizaram estudos semelhantes em que a fadiga muscular foi induzida por estimulação elétrica, e os participantes foram submetidos ao tratamento com LBP antes da indução, em diferentes tempos e energias totais e o laser foi aplicado em um único ponto no tibial anterior, o nível de CK no sangue foi menor na maioria dos grupos irradiados, exceto em um grupo utilizado a energia de 3J.

Animais submetidos a fadiga muscular e tratados com laser em baixa intensidade de 630nm, evidenciaram que o laser pode influenciar o perfil metabólico agindo como ferramenta preventiva contra a apoptose da células e sobre os níveis de CK no plasma sanguíneo. Este estudo utilizou o método de indução da fadiga muscular por estimulação elétrica. O laser foi aplicado por 40s em um único ponto do músculo gastrocnêmio imediatamente após protocolo de fadiga (SUSSAI *et al.* 2010).

De Almeida *et al.*,(2011), constatou que LBP 904 nm diminuiu significativamente nível de CK no sangue, reduziu dos níveis de expressão de mRNA para a proteína ciclooxygenase (COX) -2 e aumentou a expressão de COX-1 e os demais grupos.

A redução da atividade CK reduzida no soro do sangue, além de redução dos níveis musculares de malondialdeído (MDA) em ratos treinados em uma esteira a exaustão e aplicado LBP (632,8 nm) em um único ponto no músculo gastrocnêmio, foram os resultados apresentados pelo estudo de Liu *et al.*, (2009).

Foi realizado um protocolo clínico em dois grupos tratados com laser vermelho e infravermelho respectivamente 3 minutos antes do exercício de flexão do cotovelo resultou que a forma máxima média foi significativamente maior (12,14%) no laser vermelho e (14,49%) no laser infravermelho, os resultados apontam que tanto o laser vermelho quanto o infravermelho são eficazes em retardar a fadiga muscular (DE ALMEIDA, *et al.*, 2012).

Estudo com nove atletas de vôlei saudáveis que receberam irradiação de laser em baixa intensidade no músculo bíceps 3 minutos antes da prática de repetições de flexão do cotovelo que foi executada com carga máxima de 75% de sua força de contração voluntária máxima até a exaustão. Constatou-se um aumento da resistência para flexões e diminuição dos níveis de lactato sanguíneo pós-exercício, creatina quinase e C-reativa no grupo irradiado com laser (LEAL JUNIOR *et al.*, 2010).

Leal Junior *et al.*, (2008) em outro estudo com a participação de doze atletas profissionais ampliou o número de flexões do músculo bíceps apontando como resultados que a terapia com laser em baixa intensidade com 655 nm aparentemente retarda o aparecimento da fadiga muscular, porém não houve diminuição dos níveis de lactato no sangue. Os atletas foram irradiados em cinco pontos do músculo, depois da execução da contração voluntária máxima até a exaustão. Utilizando o mesmo desenho experimental Leal Junior *et al.*, (2009), desenvolveu outro estudo com doze atletas os resultados se assemelham em relação ao número de repetições do exercício; houve aumento em comparação com o grupo placebo e também não foi significativo a diminuição de lactato no sangue.

Estudo com a participação de 45 mulheres jovens e saudáveis distribuídas em: grupo controle; grupo treinamento e grupo treinamento mais irradiação com laser em baixa potência com 808 nm, identificou que apenas o grupo que treinou e recebeu a irradiação do laser apresentou diminuição na fadiga dos músculos extensores do joelho, indicando que um

programa de exercício de resistência combinada com laser em baixa potência pode levar a uma maior redução da fadiga muscular (VIEIRA *et al.*, 2012).

Foi utilizado o LBP com 808 nm em um protocolo de treinamento físico de repetição máxima do quadríceps femoral, realizado duas vezes por semana durante doze semanas e o LBP foi aplicado logo após a realização do exercício. De acordo com a avaliação da força de torque apenas o grupo LBP aumentou significativamente a média de pico de torque (FERRARESI *et al.*, 2011).

2.3 Laser de Baixa Potência e Estresse Oxidativo

Conforme estudos realizados por Lubart *et al.*, (2005); Fillipini *et al.*, (2005); Huang *et al.*, (2009); Liu *et al.*, (2009) existem evidências na literatura revelando que a LBP aumenta a atividade da enzima SOD e estimula a sua síntese pela célula, o que poderia explicar a diminuição dos danos oxidativos a lipídios e proteínas constatados depois da aplicação de LBP.

Pires *et al.*, (2012); Basso *et al.*, (2012) descrevem que o LBP reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que acontece durante a fase aguda de lesão epitelial e muscular. Isso acontece, mormente por acelerar o processo inflamatório e diminuir a exposição celular a ERO.

A avaliação dos efeitos da aplicação de LBP em lesões induzidas, em ratos, por 3 horas de isquemia seguida de reperfusão foi realizada com a aplicação de LBP (AsGa, 810nm) imediatamente e após 1 hora de oclusão do suprimento sanguíneo. Identificou-se que a aplicação de LBP protegeu o músculo contra os efeitos deletérios causados pela lesão isquêmica, proporcionando um aumento na atividade da creatina fosfoquinase na capacidade antioxidante total sérica e em proteínas de choque térmico. Os autores descreveram aumento na capacidade antioxidante total sérica quando a LBP foi aplicada em ratos sem a indução de lesão por isquemia/reperfusão (AVNI *et al.* 2005).

Segundo Fillipin *et al.* 2005 e Rizzi *et al.* 2006, que pesquisaram os efeitos da LBP (AsGa 904nm, contínuo, 45 mW e 5 J/cm², 35 segundos de aplicação) sobre o estresse oxidativo em modelo experimental de trauma no tendão de *Aquiles* e músculos de ratos, a LBP reduziu a perda da arquitetura normal (histologia) e a resposta inflamatória, assim como os níveis de TBARS, quando comparados ao grupo que não recebeu laser. Observaram ainda um aumento

na atividade enzimática da Sod, indicando que um dos mecanismos de redução da resposta inflamatória pela LBP possa estar relacionado à modulação da atividade da Sod.

Estudo realizado por Liu et al. (2009) com indução da lesão muscular em ratos por meio de exercícios excêntricos em esteira (corrida em *dowhill*), em que os animais receberam aplicação de LBP em 3 momentos: imediatamente após, 18 horas após e 42 horas após o protocolo de exercícios. Identificou-se que os grupos que receberam a aplicação de LBP exibiram uma melhora significativa na avaliação histológica (menor quantidade de infiltrados inflamatórios), diminuição nas concentrações de CK e da peroxidação lipídica e aumento na atividade de Sod.

Segundo Servetto et al., (2010), em uma pesquisa que tinha como foco investigar o efeito fotobiomodulador da LBP aplicada por dois lasers distintos (He-Ne, 632,8nm, contínuo, 5mW, 1min de aplicação/sessão e AsGa, 904nm, pulsado, 12mW, 47 segundos de aplicação/sessão) em um modelo experimental de miopatia, que foi induzido por meio da infiltração de adrenalina (0,05 mg/rato/dia) no músculo durante 5 dias; no grupo, em que a lesão foi desenvolvida, observou-se aumento significativo de L-citrulina e Sod e uma diminuição de óxido nítrico (NO). A aplicação de LBP diminuiu significativamente a L-citrulina e a atividade da sod e aumentou a concentração de NO.

Foram observados os efeitos da LBP aplicado em lesões de pele induzidas experimentalmente; a LBP foi aplicada sete vezes (2, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) após a formação da lesão, empregando equipamentos e doses distintas (AsGa, 904nm, pulsado, 70 mW, 60 segundos de aplicação/sessão e He-Ne, 660nm, contínuo, 30 mW, 60 segundos de aplicação/sessão). Os resultados apontaram que a aplicação da LBP foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica, os danos às proteínas e a atividade de Sod e Cat, potencializando a cicatrização da ferida, mormente nas doses de 1 e 3 J/cm² do laser de He-Ne e na dose de 3 J/cm² do laser de AsGa (SILVEIRA *et al.*, 2011).

Estudo realizado em indivíduos não treinados e irradiados com laser em baixa intensidade 5 minutos antes do exercício na esteira avaliou a fadiga, o estresse oxidativo, indicando que o uso do laser antes da execução do exercício pode estar relacionado com o atraso na fadiga muscular aumentando o desempenho e o consumo máximo de oxigênio absoluto relativo, diminuindo a indução do estresse oxidativo e lesões musculares. As atividades da LDH, lesão muscular (CK) e danos lipídios (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS) foram reduzidas (DE MARCHI *et al.* 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Verificar a ação do Laser de baixa potência na performance física e estresse oxidativo no músculo gastrocnêmico em ratos idosos submetidos a treinamento aeróbio.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a ação do LBP na capacidade aeróbia de ratos treinados e não treinado.
- ✓ Avaliar a ação do LBP na atividade oxidante (TBARS) no músculo gastrocnêmio de ratos idosos, submetidos ao exercício aeróbio.

- ✓ Avaliar a ação do LBP na atividade anti-oxidante (CAT, GPx,SOD) no músculo gastrocnêmio de ratos idosos, submetidos ao exercício aeróbio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de Experimentação

A amostra foi composta por 30 ratos (*norvergicos albinus*), de linhagem Wistar machos, sendo 24 animais idosos com 24 meses com peso corporal médio de $517,7 \pm 27,54$ g e 6 animais jovens com 12 semanas e peso médio de $266,0 \pm 19,30$ g, provenientes do Biotério da Universidade Federal Paulista (UNIFESP), mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, com água e alimentação *ad libitum*. Liberados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Paulista (UNIFESP) através do processo 0022/2012.

4.2 Grupos Experimentais

- Os animais foram randomizados e divididos em 5 grupos:
- Grupo idoso controle (GIC) – sem irradiação à LBP e não praticou o treino.
- Grupo jovem controle (GJC) – sem irradiação à LBP e não praticou o treino.
- Grupo Idoso laser (GIL) - irradiação à LBP e não praticou o treinamento.
- Grupo Idoso exercício (GIE) – sem irradiação somente praticou o treinamento.
- Grupo Idoso laser e exercício (GLE) – irradiação à LBP e praticou o treinamento.

4.3 Procedimentos Realizados

4.3.1 Capacidade aeróbia em esteira - consumo máximo de oxigênio (VO_{2max})

O consumo de oxigênio (VO_2) e a produção dióxido de carbono (VCO_2) foram avaliados em esteira rolante sem inclinação (Panlab/Harvard-Apparatus, Harvard Bioscience Company, Massachusetts, USA), com os animais permanecendo dentro de uma caixa conectada à analisador de gases (Panlab/Harvard-Apparatus Oxylet System, Harvard Bioscience Company, Massachusetts, USA), equipado com sensor de O_2 diodo LBP (resolução: 0,01%) e sensor de CO_2 infravermelho (resolução: 0,01%). Antes e após todos os testes, o sistema foi calibrado com concentrações conhecidas de O_2 , CO_2 e N_2 , como recomendado pelo fabricante.

O fluxo de ar na caixa sobre a esteira foi mantido entre 1,2 l/min e 2,0 l/min, conforme o peso do animal. A fração de oxigênio no ar efluente foi registrada a cada segundo. Todos os animais foram submetidos a três dias de familiarização ao exercício em esteira antes da determinação do VO_{2max} . Em cada dia de adaptação, os animais realizaram o exercício por 15 minutos da seguinte forma: 1º dia: 25 cm/s (5 minutos), 35 cm/s (5 minutos) e 45 cm/s (5 minutos); 2º dia: 25 cm/s (5 minutos), 45 cm/s (5 minutos) e 55 cm/s (5 minutos); 3º dia: 25 cm/s (5 minutos), 55 cm/s (5 minutos) e 65 cm/s (5 minutos). Para determinação do VO_{2max} , os animais realizaram aquecimento por 2 minutos com velocidade da esteira fixada a 25 cm/s.

Por seguinte, a velocidade de corrida foi aumentada em 9 cm/s a cada 2 minutos até inabilidade do animal em manter o exercício. Os seguintes critérios foram adotados para caracterizar o VO_{2max} (WISLOFF et al., 2001): (1) estabilidade do VO_2 na vigência de aumento da intensidade do exercício; (2) razão de troca respiratória acima de 1,05. O VO_{2max} foi expresso em $ml.kg^{-1}.min^{-1}$ e, segundo a escala alométrica, em $ml/kg^{0,75}/min^{-1}$, que representa o VO_{2max} por unidade de massa magra do animal. O VO_{2max} foi analisado antes, e ao final de seis semanas de treinamento .

4.3.2 Procedimento de Treinamento

O protocolo de treinamento por natação seguiu a metodologia de Takeda *et al.*, (1988), e foi dividido em duas fases:

1. Adaptação à natação – No primeiro dia de exercício, os animais nadaram por 15 minutos e a cada dia foram acrescidos 15 minutos até que no sexto dia os animais foram capazes de nadar por 90 minutos.
2. Treinamento propriamente dito – O tempo de treinamento foi mantido em 90 minutos, 6 vezes por semana, por 6 semanas.

4.3.3 Aplicações do LBP

Foi utilizado o LBP da marca DMC[®] modelo Photon LBP III, com potência de 100mW (densidade de potência de $1,07 W/cm^2$), área do feixe de $0,028cm^2$, e comprimento de onda de $\lambda 830nm$, meio ativo de Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP). A aplicação deu-se pelo método transcutâneo sob a forma de três pontos no músculo gastrocnêmico sendo um proximal, um central e outro distal do músculo; com energia total de 4 joules por ponto, densidade de energia de $144 J/cm^2$, tempo de 40 segundos. A aplicação foi realizada antes de cada sessão de treino tanto no grupo idoso treino como no grupo que recebeu apenas laser (SUSSAI *et al.*, 2010).

4.3.4 Eutanásia

Ao final do período de 6 semanas de treinamento os animais dos Grupos GIC; GJC; GIL, GIE e GLE foram identificados e, posteriormente foram eutanasiados, seguindo o protocolo AVMA (American Veterinary Medical Association) Panel on Euthanasia, 2001.

4.3.5 Coleta dos Materiais

O músculo Tríceps Sural foi coletado cirurgicamente e foi realizado um procedimento de dissecação para a obtenção do músculo gastrocnêmico. O músculo gastrocnêmico foi pesado em equipamento específico e dividido em duas partes. As amostras resultantes foram encaminhadas da seguinte forma: uma parte foi destinada para a realização dos procedimentos histológicos, a outra parte destinada as análise de estresse oxidativo.

4.3.6 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

A fim de verificar o *status* antioxidante, as atividades enzimáticas de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e de glutathiona peroxidase (GPx) foram determinadas no músculo gastrocnêmio direito dos animais. Como um indicador da peroxidação lipídica (danos à membrana do músculo), avaliou-se a concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no mesmo tecido. Os métodos para a determinação destas variáveis foram baseados nos estudos de VIEIRA JUNIOR, et al. 2013:

4.3.7 Catalase (CAT)

Para a determinação da atividade de CAT, as amostras de tecido muscular foram colocadas em tubos Eppendorf[®] gelados contendo 1 ml de tampão fosfato 0,05N (composição, em g/L: KH₂PO₄, 1,34 e NaHPO₄ 2H₂O, 7,1), sonicadas e centrifugadas a 10.000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para posterior análise por meio de *kits* comerciais (Cayman Chemical[®], Michigan, EUA).

Superóxidos Dismutase (SOD) e Glutathiona Peroxidase (GPx)

Para a determinação da atividade de SOD e CAT, as amostras de tecido muscular foram imediatamente lavadas com PBS (pH 7,4) contendo heparina (0,16mg/ml), a fim de remover as células sanguíneas. Imediatamente após, as amostras foram homogeneizadas (em gelo), em 1ml de tampão HEPES (20 mM, pH 7,2) contendo (em mM): 1 EGTA, Manitol 210 e sacarose 70, bem como centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm (4°C). O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para análise posterior de SOD total (citoplasmática e mitocondrial) e GPx por meio de *kits* comerciais (Cayman Chemical[®], Michigan, EUA).

4.3.8 Biomarcadores de Peroxidação de Lipídios: Concentração TBARs

Para a determinação das concentrações de TBARs, as amostras de tecido muscular foram colocadas em Eppendorf[®] gelados contendo 1,5 ml de tampão fosfato 0,05 N (composição, em g/L: KH₂PO₄, 1,34 e NaHPO₄ 2H₂O, 7,1), homogeneizadas em Polytron[®] e centrifugadas durante cinco minutos a 10.000 rpm. Feito isso, o sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para análise posterior por meio de *kits* comerciais (Cayman Chemical[®], Michigan, EUA).

4.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores de VO_{2max} pós-treinamento foram comparados One-way ANOVA com teste post-hoc de Tukey. Esses grupos também foram One-way ANOVA com post hoc de Tukey foram aplicados na análise do estresse oxidativo. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média e as diferenças com p <0,05 foram considerados significativos.

**5. Resultados – Artigo submetido ao periódico:
Lasers in Medical Science - ISSN: 0268-8921 (Print)**

Lasers in Medical Science

The low-level laser therapy (LLLT) in oxidative stress and on the functional fitness of elderly rats subjected to aerobic training for swimming

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	The low-level laser therapy (LLLT) in oxidative stress and on the functional fitness of elderly rats subjected to aerobic training for swimming
Article Type:	Original Article
Keywords:	Low-Level Laser; Aerobic Exercise; Oxidative Stress; VO2max allometric.
Corresponding Author:	Paulo de Tarso Camillo Carvalho, PhD University Nove de Julho-UNINOVE Campinas , São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University Nove de Julho-UNINOVE
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Simone A Guaraldo, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Simone A Guaraldo, MSc Andrey Jorge Serra, PhD Eliane M Amadio, MSc Ednei Luis Antonio, MSc Flavio Silva, MSc Leslie Andrews Portes, MSc Paulo José Ferreira Tucci, PhD José A Silva Junior, PhD Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior, PhD Paulo de Tarso Camillo Carvalho, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Purpose: The aim of the present study was to determine whether low-level laser therapy (LLLT), when used in conjunction with aerobic training, interferes with the oxidative stress, thereby influencing the performance of old rats participating in swimming. Materials and Methods: A total of 30 Wistar rats (norvergicos albinus) were used for this study: 24 aged rats, and 6 young rats. The older animals were randomly divided into 4 groups designated as follows: Aged-Control, Aged-Exercise, Aged-LLLT, Aged-LLLT/Exercise group and. Young-Control animals. Aerobic capacity (VO2max) was analyzed after and before the training period. The Aged-Exercise and Aged-LLLT/Exercise groups were trained for 6 weeks. LLLT laser was applied at 808 nm and 4 joules of energy to the indicated groups throughout training. The rats were euthanized, and muscle tissue were collected for analysis the index of lipid peroxidation (TBARs), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity. Results: Statistically significant differences in VO2max values were observed for the Aged-LLLT/Exercise group before and after intervention ($p < 0.0001$). The results indicate that the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) was superior and estatisticamente significant ($p < 0.05$) in the association of LLLT and exercise when compared to the LLLT group and group exercise. Was also observed that young animals presented for</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

the activity of antioxidant enzymes smaller and statistically significant values the Aged group. The LLLT plus exercise and only the LLLT and training (exercise group) was also able to mitigate the concentration of TBARS with ($p > 0.05$). Conclusion: These results suggest therapy laser que in Conjunction with aerobic training may provide the therapeutic approach for reducing oxidative stress. Regarding performance, the LLLT plus exercise training improved VO2max levels However it was not possible to show Improves the physical performance of aged rats compared to the exercise group (training).

Blinded Manuscript

[Click here to view linked References](#)

**The Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Oxidative Stress and on the Functional
Fitness of Elderly Rats Subjected to Aerobic Training for Swimming**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1

Abstract

Purpose: The aim of the present study was to determine whether low-level laser therapy (LLLT), when used in conjunction with aerobic training, interferes with the oxidative stress, thereby influencing the performance of old rats participating in swimming. **Materials and Methods:** A total of 30 Wistar rats (*norvergicos albinus*) were used for this study: 24 aged rats, and 6 young rats. The older animals were randomly divided into 4 groups designated as follows: Aged-Control, Aged-Exercise, Aged-LLLT, Aged-LLLT/Exercise group and. Young-Control animals. Aerobic capacity ($VO_2^{0.75\max}$) was analyzed after and before the training period. The Aged-Exercise and Aged-LLLT/Exercise groups were trained for 6 weeks. LLLT laser was applied at 808 nm and 4 joules of energy to the indicated groups throughout training. The rats were euthanized, and muscle tissue were collected for analysis the index of lipid peroxidation (TBARS), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity. **Results:** Statistically significant differences in $VO_2^{0.75\max}$ values were observed for the Aged-LLLT/Exercise group compared to the baseline older group ($p < 0.01$) and compared with LLLT and exercise group ($p < 0.05$). The results indicate that the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) was superior and statistically significant ($p < 0.05$) in the association of LLLT and exercise when compared to the LLLT group and group exercise. Was also observed that young animals presented for the activity of antioxidant enzymes smaller and statistically significant values the Aged group. The LLLT plus exercise and only the LLLT and training (exercise group) was also able to mitigate the concentration of TBARS with ($p > 0.05$). **Conclusion:** These results suggest that laser therapy in conjunction with aerobic training may provide a therapeutic approach for reducing oxidative stress, as well as the increase in $VO_2^{0.75\max}$ allometric, indicating along with increasing speed media improved performance in aged animals treated with LLLT associated with aerobic training by swimming

Keywords: low-level laser, aerobic exercise, oxidative stress, $VO_2\max$ allometric.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

In the aging process, accumulation of mitochondria DNA mutations, impairment of oxidative phosphorylation as well as an imbalance in the expression of antioxidant enzymes results in further overproduction of ROS. This mitochondrial dysfunction-elicited ROS production axis forms a vicious cycle, which is the basis of mitochondrial free radical theory of aging.(1) Reactive oxygen species (ROS) may play a relevant role in the neuromuscular degeneration process, with consethatnt loss of fibers and muscle function.(2) These results could be more pronounced for the elderly population where sedentary life style and age-related physiological dysfunctions could impair antioxidant defense and increase susceptibility to oxidative stress and muscle damage.(3)

Exercise Represents the physical stress that transiently disrupts homeostasis and skeletal muscle is the working clearly the organ most directly affected during physical activity. Studies indicate that exercise may induce structural damage to muscle cells, and the production of metabolic by-products, such as lactate, and reactive oxygen species (ROS) (4). However studies claim physical training increases the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase, helping to combat free radical formation of oxidative metabolism. (5) Although there is some inconsistency present within the literature, it is clear that both aerobic and anaerobic exercises have the potential to result in increased free radical production, which may or may not result in acute oxidative stress the extent of redox homeostasis disturbance induced by an acute bout of exercise depends on many factors, inter alia, exercise mode, intensity and duration, participant's state of training, gender, age, and nutritional habits (3).

The low-level laser therapy (LLLT) has also been used to boost repair processes by reducing pro-inflammatory markers, including TNF- α and IL1- β , as well as increasing anti-inflammatory cytokines, such as IL-10. (6,7,8) More recently, researchers have shown that in addition to the modulatory effects of LLLT on inflammatory processes, LLLT also results in the reduction of creatine kinase levels immediately after exercise.(9) LLLT also acts on the markers of oxidative stress, such as protein carbonyls, superoxide dismutase, and TBARS,(10)in addition to yielding

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

clinical signs of improvement, delayed muscle fatigue, and improved physical performance.(11,12,13,14,15)

Considering the anti-inflammatory properties of exercise training and LLLT, here we wanted to determine whether LLLT, when associated with aerobic training, interferes with oxidative stress thus influencing the performance of old rats subjected to exercise in the form of swimming.

Materials and Methods

Experimental animals

A total of 30 Wistar rats (*norvegicos albinus*) were used in this study, with the animal groups consisting of 24 aged animals (24-months old) with a mean body weight of 517.7 ± 27.54 g and 6 young animals (12-weeks old) with a mean body weight of $266, 19:30 0 \pm$ g. The animals were from the Animal Facility of the Federal University of São Paulo (UNIFESP), where they were housed and kept under conditions with controlled light and temperature, and with water and food “*ad libitum*”. All the experimental procedures were carried out in accordance to the standards established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). The animals were handled in compliance with the national guidelines for the humane treatment of laboratory animals. All the experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee of the UNIFESP.

Experimental groups

The twenty four animals (24 aged) were randomly divided into four groups, with 6 animals per group. The experimental groups were assigned as follows: the Aged-Control group (ICG) with no LLLT irradiation and no exercise training; the Young-Control group (FCG) with no LLLT irradiation and no exercise training; the Aged-LLLT group (GLI) treated with LLLT irradiation and no exercise training; and the Aged-LLLT/Exercise group (GLTI) treated with irradiation and subjected to exercise training. Still to experimental groups used 6 young animals that call: Young-Control group (FCG) with no LLLT irradiation and no exercise training. Thus we totaled a sample of 30 animals (24 animals aged 6 and younger animals).

Functional fitness assessment (maximal oxygen uptake, VO_2 max)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The test protocol to assess functional fitness was performed using a motorized treadmill coupled with a gas analyzer (Panlab, Harvard Bioscience Company, MA, USA) in which VO_2 and VCO_2 were continuously recorded. Three days prior to testing, the rats were introduced to running on the treadmill for 15 min (5-min stages) as follows: first day (25 cm/s, 35 min/s, 35 cm/s); second day (25 cm/s, 45 min/s, 55 cm/s); and third day (25 cm/s, 55 min/s, 65 cm/s). To evaluate VO_{2max} , each rat had to undergo a 2-min warm-up period at 25 cm/s, and the treadmill speed was increased by 9 cm/s every 2 min to reach physical exhaustion. The VO_{2max} is showed as an allometric score ($ml / kg^{0.75} / min^{-1}$), which is a $VO_{2max} / lean$ body mass ratio was performed before and after the exercise training.

Exercise training

The exercise training consisted of swimming in a pool built using a fiberglass water box with a diameter of 130 cm and a height of 80 cm. The water was heated by a thermostat associated with a gas heating system to temperatures ranging from 32° to 34°C. The training protocol was based on the study of Takeda et al (1988)²⁰ and was divided into two phases:

1. Adaptation: On the first day of exercise, the animals swam for 15 min and for times increased by 15 min on each subethatnt day until the sixth day when the animals were able to swim for 90 min.

2. Main training: The training time was maintained at 90 min, 6 times a week for 6 weeks.

Low-level laser application

The DMC Laser Photon Laser III ® (DMC - Sao Carlos, SP, Brazil) system was used for irradiation with conditions as shown in Table 1. The laser was applied transcutaneously, the irradiation took place in 3 points for 40 s / point in the central area, proximal and distal of the muscle gastrocnemius according Sussai (2010)¹⁰. The application was done before every training session for both in the specified aged group that received exercise training and the group that received LLLT only.

Euthanasia

At the end of the 6-week training period, animals from each experimental group were identified, weighed, and then euthanized by decapitation according to the protocol

1 detailed in the Report of the AVMA Panel on Euthanasia (2001).

2 The gastrocnemius muscle was collected immediately after euthanasia. The incised
3 areas were surgically removed with a 1-cm margin of skin surrounding the lesion to the
4 depth of the fascia. The muscle (two from each animal) was divided into two parts, with
5 one piece intended for histological analysis, and the other piece frozen for subsehatnt
6 analysis the index of lipid peroxidation (TBARS), glutathione (GSH), superoxide
7 dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity.
8
9
10
11
12
13

14 **Biomarkers of oxidative stress**

15
16 In order to verify the antioxidant status, the enzymatic Activities of catalase
17 (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) Were
18 determined in gastrocnemius muscle animal rights. As an indicator of lipid peroxidation
19 (damage to muscle membrane), we availed the concentration of substances that react
20 with thiobarbituric acid (TBARS) in the same tissue, based on Vieira Junior et al
21 protocol. (2014) (16).
22
23
24
25
26
27

28 **Catalase (CAT)**

29
30 For determination of CAT activity, the muscle tissue samples were placed on ice
31 Eppendorf tubes containing 1 ml of 0.05 N phosphate buffer (composition in g / L
32 KH_2PO_4 : 1.34 and $2\text{H}_2\text{NaHPO}_4$, 7, 1), sonicated and centrifuged at 10,000 rpm for
33 five minutes. The supernatant was separated and stored at -20°C for subsehatnt
34 analysis using commercial kits (Cayman Chemical®, Michigan, USA).
35
36
37
38
39
40

41 **Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx)**

42
43 For determination of GPx and SOD activity, the muscle tissue samples were
44 washed once with PBS (pH 7.4) containing heparin (0.16 mg / ml) to remove blood
45 cells. Immediately after the samples were homogenized (on ice) in 1 ml of HEPES
46 buffer (20 mM, pH 7.2) containing (in mM): EGTA 1, mannitol and sucrose 70 210,
47 and centrifuged for 15 minutes at 10,000 rpm (4°C). The supernatant was separated
48 and stored at -20°C for subsehatnt analysis of total SOD (cytoplasmic and
49 mitochondrial) and GPx using commercial kits (Cayman Chemical®, Michigan, USA).
50
51
52
53
54
55
56
57

58 **Biomarkers of lipid peroxidation:**

Concentrations the Thiobarbituric Acid (TBARS)

For the determination of TBARS concentrations, muscle tissue samples were placed on ice Eppendorf containing 1.5 ml of 0.05 N phosphate buffer (composition in g / L: KH₂PO₄, 1.34 NaHPO₄ 2H₂ O and 7, 1) in POLYTRON® homogenized and centrifuged for five minutes at 10,000 rpm. Then, the supernatant was separated and stored at -20 ° C for subseqatnt analysis using commercial kits (Cayman Chemical®, Michigan, USA).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The post-training VO₂max values were compared using one-way ANOVA with a Tukey post-hoc test. Data from the biomarkers of oxidative stress analysis were also compared using one-way ANOVA with a Tukey post hoc test. Data are expressed as mean ± standard deviation of the mean, and differences with p < 0.05 were considered significant.

Results

Results

Functional fitness assessment (maximal oxygen uptake, VO₂max)

Assessment of cardiopulmonary function was conducted using the standard approach before and after swim training. Statistical analysis in were compared only the groups using one-way ANOVA with Tukey post-hoc test. In the comparison between the control group and Young-Aged Control group for values of VO₂max^{0.75} baseline, the elderly groups who received the intervention (Laser /Exercise; Laser, Exercise). We also present results for the speed average of the animals at baseline and after the intervention format. Figure 1.

Biomarkers for oxidative stress

Activity of the Catalase enzyme (CAT)

The mean value of the CAT activity (umol/min.mg protein) Young group (0.75±0.1) ; Aged (0.32 ± 0.09) ; Aged LLLT / Exercise (1.50±0.18); Aged - LLLT (0.64±0.19) and Aged – Exercise(1.1±0.13). The Activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT) in skeletal muscle the aged rats was significantly different the young

7

1 group ($p < 0.05$), before training. While when comparing the Aged group before
2 training with the groups that suffer intervention (LLLT plus exercise, LLLT and
3 Exercise) all showed higher values and statistical difference ($p < 0.05$ and $p < 0.01$), we
4 may also see a higher elevation antioxidant enzyme in this group of associated therapies
5 (LLLT plus exercise) regarding LLLT ($p < 0.05$) and the exercise group. Such results
6 demonstrate increase of 78.6% in the activity of this enzyme in the LLLT plus exercise
7 compared with the aged control and increase of 70.9% in the exercise compared with
8 the aged control. Figure 2.

15 Activity of the Superoxide Dismutase (SOD)

17 Mean concentration of the Superoxide Dismutase (SOD) activity (U/ml), Young
18 group (9.8 ± 2.1); Aged (4.1 ± 1.4); Aged LLLT / Exercise (15.3 ± 1.8); Aged - LLLT
19 (9.4 ± 2.0) and Aged - Exercise (10.1 ± 1.7). The Activities of the antioxidant SOD in
20 skeletal muscle the aged rats was significantly different the young group ($p < 0.05$),
21 before training and between the young group (no training), the Aged LLLT plus
22 exercise group ($p < 0.01$). While when comparing the Aged group before training with
23 the groups that suffer intervention (LLLT plus exercise, LLLT and Exercise) all showed
24 higher values and statistical difference ($p < 0.05$ and $p < 0.01$), we may also see a higher
25 elevation antioxidant enzyme in this group of associated therapies (LLLT plus exercise)
26 regarding LLLT ($p < 0.05$) and the exercise group. Such results demonstrate increase of
27 73.2% in the activity of this enzyme in the LLLT plus exercise compared with the aged
28 control and increase of 59.4 % in the exercise compared with the aged control. Figure
29 3.

42 Activity of the Glutathione Peroxidase (GPx)

44 During the analysis the GPx activity (nmol / min / 100 mg), during the analysis
45 the GPx activity (nmol / min / 100 mg), we obtained the mean concentration: Young
46 group (12.0 ± 1.9); Aged (6.2 ± 1.6); Aged LLLT / Exercise (17.3 ± 1.4); Aged - LLLT
47 (10.4 ± 2.1) and Aged - Exercise (13.1 ± 1.2). The Activities of the antioxidant GPx in
48 skeletal muscle the aged rats was significantly different the young group ($p < 0.05$),
49 before training and between the young group (no training), the Aged LLLT plus
50 exercise group ($p < 0.01$). While when comparing the Aged group before training with
51 the groups that suffer intervention (LLLT plus exercise, LLLT and Exercise) all showed

1 higher values and statistical difference ($p < 0.05$ and $p < 0.01$), we may also see a higher
2 elevation antioxidant enzyme in this group of associated therapies (LLLT plus exercise)
3 regarding LLLT ($p < 0.05$) and the exercise group. Such results demonstrate increase of
4 64.1% in the activity of this enzyme in the LLLT plus exercise compared with the aged
5 control and increase of 52.6 % in the exercise compared with the aged control. Figure
6
7
8
9 4.

10 11 **Biomarkers of lipid peroxidation:**

12 Concentrations the Thiobarbituric Acid (TBARS)

13
14
15
16 The thiobarbituric acid (TBARS) mean value (nmolMDA/mg protein) , during the
17 analysis, we obtained the mean concentration: Young group (10.0 ± 1.1); Aged ($18.2 \pm$
18 2.4); Aged LLLT / Exercise (7.3 ± 1.8); Aged - LLLT (9.3 ± 1.8) and Aged – Exercise
19 (11.1 ± 1.6). The activities of the oxidant TBARS in skeletal muscle the aged rats was
20 significantly different the young group ($p < 0.01$), before training and between the young
21 group (no training), the Aged LLLT plus exercise group ($p < 0.01$). While when
22 comparing the Aged group before training with the groups that suffer intervention
23 (LLLT plus exercise, LLLT and Exercise) all showed minors values and statistical
24 difference ($p < 0.05$ and $p < 0.01$). When comparing the aged group before training with
25 the groups that suffer intervention (LLLT plus exercise, LLLT and Exercise) showed all
26 minors values and statistical difference ($p < 0.05$ and $p < 0.01$), we can also verify that
27 the association between LLLT and exercise presented oxidant activity with a minor
28 when compared with the aged LLLT group and exercise aged group. ($p < 0.05$) Figure 5.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Discussion**

42
43 This study had as base axis two points: The aging is connected to the presence of
44 oxidative stress and the literature indicates the aerobic physical activity to improve
45 cardio-respiratory function in the elderly and in the control of chronic disease so
46 common during aging such as high blood pressure and diabetes mellitus systemic.
47 However there controversy in the literature on the role of physical exercise in oxidative
48 stress. According to several studies, LLLT reduces oxidative stress markers and
49 improve the defenses antioxidants in several clinical and experimental circumstances as
50 well as recent studies have shown that LLLT has improved the physical performance
51 top athletes and alleviating muscle fatigue. We got up in the present study the
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 hypothesis that LLLT in conjunction with aerobic training may be an effective approach
2 to reduce oxidative stress markers, in skeletal muscle; and the and the possibility that
3 LLLT plus swimming training could improve the functional performance of old rats.
4

5 Although the physical activity of moderate to high intensity are able to generate
6 oxidative stress in different degrees (17), literature data remains without consensus. In
7 some cases have been shown to increase the oxidative stress in aerobic and anaerobic
8 exercises, while other studies show TBARS levels unchanged in both exercises (18)
9

10 This study is the VO₂max values showed the an allometric score which is the
11 VO₂max / lean body mass ratio and our results point to improvement in aerobic
12 performance with LLLT associated with exercise swimming in aged rats. This group
13 (LLL / exercise) was higher than the other groups at increased VO₂max^{0.75}, causing
14 the values to stay up to VO₂max^{0.75} from baseline of young animals, this was sufficient
15 to cause increase statistical difference compared to the group that was trained only
16 (exercise group) and LLLT.
17

18 During the exercise, many physiological systems dynamically interact with each
19 other (19). Among these, there are the cardiopulmonary interactions and the muscle's
20 ability to use oxygen (20). The VO₂ max is accepted and regarded as the best measure
21 to determine the cardiovascular stability and the ability to perform physical exercise.
22 (21). The maximal oxygen uptake (Vo₂max) declines with age. Although the rate of
23 this decline is estimated to be 10% per decade in sedentary subjects, some investigators
24 have reported that neither stroke volume nor maximal cardiac output decreases with
25 advancing age, and others have found no evidence of reduced oxygen extraction in older
26 versus younger individuals.(22).
27

28 Our results corroborate the above authors(21,22) considering that the
29 comparison between the young and elderly control groups VO₂max^{0.75} values were
30 higher than in young animals, however our results demonstrate a significant increase in
31 laser and exercise groups, as the group held only exercise training for swimming.
32

33 Clinical study by de Marchi et al. (9), evaluated the effects
34 of low-level laser therapy (LLL) on exercise performance, oxidative stress, and muscle
35 status in humans. We conducted a double-blind placebo-controlled randomized
36 crossover trial with 22 untrained male volunteers subjected to irradiation by LLLT. the
37 authors analyzed exercise performance (VO₂ max, time to exhaustion, aerobic threshold
38 and anaerobic threshold), levels of oxidative damage to lipids and proteins, the
39
40
41

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the markers of creatine kinase muscle damage (CK) and lactate dehydrogenase (LDH), and conclude that the use of LLLT before progressive-intensity running exercise increases exercise performance, decreases exercise-induced oxidative stress and muscle damage, suggesting that the modulation of the redox system by LLLT could be related to the delay in skeletal muscle fatigue observed after the use of LLLT.

Reactive oxygen species, such as superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radicals ($OH^{\bullet-}$), cause the oxidation of membrane phospholipids, proteins and DNA . Such modifications have been implicated in a variety of pathological conditions. Under physiological conditions, the toxic effects of an increase in free radicals can be prevented by antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), and by nonenzymatic antioxidants . However, when the excess production of free radicals occurs, oxidative stress has deleterious effects on the structural and functional integrity of cells and tissues.(23)

Despite the study, de Marchi et al. (9) have performed their study in young individuals, our results for the antioxidant activity of LLLT, LLLT plus exercise and exercise only showed an increase in activity of the enzyme Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD). These results were further confirmed by the analysis of glutathione peroxidase enzyme activity (GPx).

In the present study we observed that the group aged presented TBARS mean concentrations higher compared with the exercise (trained) group, LLLT group and LLLT plus exercise (trained) which indicates reduction of the lipid peroxidation in the membrane of the muscle fiber of the muscle of the intervention group animals. This association of LLLT plus exercise also was able to increase the activity of enzymes antioxidants (CAT, SOD and GPx), in addition to decrease the concentration of TBARS in gastrocnemius muscle of aged rats.

The CAT enzyme, found in the peroxisomes, play a specific role to metabolize the hydrogen peroxide, a highly toxic substance to the cell. The SOD enzyme has three isoforms present in the human body: SOD1 is present in the cytoplasm, SOD2 in the mitochondria and SOD3 in the extracellular fluid. This enzyme catalyzes the dismutation (oxidation and reduction redox reaction) of the superoxide in oxygen and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

hydrogen peroxide. The GPx enzyme, found in the mitochondria, has the role to reduce hydroperoxides to alcohols and hydrogen peroxide to water.(16)

Ferraresi, Hamblin, and Parizotto (24) reported that phototherapy (LLLT and light-emitting diode therapy (LEDT)) Has Been used to combat ROS and reactive nitrogen species (RNS) delivered during physical exercise to improve the reduction of mitochondrial function, which contributes to the reduction of muscle fatigue to increase muscle performance.

Biasibetti et al.(23)Conducted a study whose was aim evaluate the influence of low-level laser therapy (LLLT) on parameters of oxidative stress and DNA damage in skeletal muscle and plasma of rats with HF, and concluded that the laser therapy Appears to reduce SOD activity and DCFH oxidation levels, changing the oxidative balance in the skeletal muscle of HF rats. Otherwise, high doses of LLLT seem to Increase DNA damage.

In a study aimed at analyzing the effects of low-level laser therapy (LLLT) on oxidative stress and fibrosis in experimental model of an achilles tendon injury, Fillipin et al. (25), described that the LLLT has been reported to induce SOD levels increases in different models. The increase in the activity of this enzyme antioxidant, by reducing oxidative stress, could contribute to alleviate the injury to the soft tissue and the development of to prevent fibrosis.

Fonseca et al. (26) reported that lipid peroxidation can be assessed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as a biochemical index of oxidative damage by free radicals. The authors conducted a study to evaluate the effects of the low-intensity infrared laser on plasma protein content and oxidative stress in blood and concluded that LLLT Increases plasma protein content and causes oxidative stress, lipid peroxidation and inducing Increasing myeloperoxidase activity, Which Could depend of fluency and frethatncy, in blood samples.

LLLT effects on ROS production are still controversial. It has been suggested that LLLT could enhance ROS production activity of human neutrophils by the activation of the superoxide converting system, and there is a report that LLLT irradiation enables a more rapid activation of the superoxide production system. However, laser irradiation has been demonstrated to reduce oxidative stress in different situations such as isolated human neutrophils, during abdominal surgery or in vitro in liposome membranes.(25)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The antioxidant defense system was improved in the gastrocnemius muscle of the animals aged submitted to irradiation with LLLT associated with aerobic training when compared with aged rats (exercise group, LLLT group and control group aged). These results indicate that regular physical exercise plus LLLT can be important strategy to fight the supraphysiological production of ROS, since it increased the antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation reduced the muscle in the gastrocnemius. These findings may have influenced, at least partially, on the increase $VO_2 \max^{0.75}$ the of the animals.

Reference

1. Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: Implication in the pathophysiology of aging *Exp Biol Med* (Maywood). 2013 May; 238(5):450-60. doi: 10.1177/1535370213493069.
2. Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Oct;45(10):2288-301. doi: 10.1016/j.biocel.2013.06.024
3. Bouzid MA, Hammouda O, Matran R, Robin S, Fabre C. Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise. *PLoS One*. 2014 Mar 11;9(3):e90420. doi: 10.1371/journal.pone.0090420. eCollection 2014
4. Lima FD, Stamm DN, Della-Pace ID, Dobrachinski F, de Carvalho NR, Royes LF, Soares FA, Rocha JB, González-Gallego J, Bresciani G. Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. *PLoS One*. 2013;8(2):e55668. doi: 10.1371/journal.pone.0055668
5. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*. 1999;31(7): 987-997.
6. Souza NH, Marcondes PT, Albertini R, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Aimbire F. Low-level laser therapy suppresses the oxidative stress-induced glucocorticoids resistance in U937 cells: Relevance to cytokine secretion and histone deacetylase in alveolar macrophages. *J Photochem Photobiol B*. 2013;(26)130C:327–336.
7. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R116.
8. Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochem Photobiol*. 2012;88(6):1546–50.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

9. De Marchi T, Leal Junior EC, Bortoli C, Tomazoni SS, Lopes-Martins RA, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):231–6

10. Sussai DA, Carvalho Pde T, Dourado DM, Belchior AC, dos Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci.* 2010;25(1):115–20

11. Baroni BM, Leal Junior EC, De Marchi T, Lopes AL, Salvador M, Vaz MA. Low-level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2010 Nov;110(4):789-96

12. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Frigo L, et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise-induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2010;40(8):524–32

13. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Dalan F, et al. Effect of 655-nm low-level laser therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(5):419–24.

14. Leal-Junior EC, Vanin AA, Miranda EF, et al. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2013 Nov 19.

15. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 2006;101(1):283–8.

16. Vieira Junior Roberto Carlos, Silva Carolina Mendes Santos, Araújo Michel Barbosa de, Garcia Alesandro, Voltarelli Vanessa Azevedo, Reis Filho Adilson Domingos. Aerobic swimming training increases the activity of antioxidant enzymes and the glycogen content in the skeletal muscle of rats. *Rev Bras Med Esporte.* 2014 ; 19(3): 204-208.

17. Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol.* 2003 Aug;28(4):588-604.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

18. Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 Sep;32(9):1576-81.

19. Richardson, R.S.; Tagore, K.; Haseler, L.J.; Jordan, M.; Wagner, P.D. Increased VO2 max with right-shifted Hb-O2 dissociation curve at a constant O2 delivery in gog muscle in situ. *J. Appl. Physiol.* 1998.84 (3): 995-1002.

20. Bearden, S. E.; Moffatt, R.J.(2000). VO2 Kinetics and the O2 deficit in heavy exercise. *J.Appl. Physiol.* 88(4): 1407 – 1412.

21. Fletcher, G.F.; Balady, G.J.; Amsterdam, E.A.; Chaitman, B.; Eckel, R.; Fleg, J.; Froelicher, V.F.; Leon, A.S.; Pina, I.L.; Rodney, R.; Simons-Morton, D.A.; Williams, M.A.; Bazzare, T. Exercise Standards for Testing and Training: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation.* (2001). 104 (14): 1694-1740.

22. Ogawa T, Spina RJ, Martin WH 3rd, Kohrt WM, Schechtman KB, Holloszy JO, Ehsani AA. Effects of aging, sex, and physical training on cardiovascular responses to exercise. *Circulation.* 1992 Aug;86(2):494-503.

23. Biasibetti M, Rojas DB, Hentschke VS, Moura DJ, Karsten M, Wannmacher CM, Saffi J, Dal Lago P. The influence of low-level laser therapy on parameters of oxidative stress and DNA damage on muscle and plasma in rats with heart failure. *Lasers Med Sci.* 2014 Nov;29(6):1895-906. doi: 10.1007/s10103-014-1597-1.

24. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med.* 2012 Nov 1;1(4):267-286

25. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, González-Gallego J. Low-Level Laser Therapy (LLLT) Prevents Oxidative Stress and Reduces Fibrosis in Rat Traumatized Achilles Tendon *Lasers Surg Med.* 2005 Oct;37(4):293-300. doi: 10.1002/lsm.20225

26. da Fonseca Ade S, Presta GA, Geller M, de Paoli F, Valença SS. Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induces oxidative stress in vitro *Lasers Med Sci.* 2012 Jan;27(1):211-7. doi: 10.1007/s10103-011-0945-7

Tables

Table 1. Summary of the laser parameters.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure legend

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1. Comparison of the mean and standard deviation on functional fitness assessment (maximal oxygen uptake, allometric $\text{VO}_2 \text{ máx}^{0.75}$), * denotes $p < 0.05$ and ** denotes $p < 0.01$ and, using Tukey's test with comparisons against the Young-Control group; # denotes $p < 0.05$ and ## denotes $p < 0.001$ using Tukey's test with comparisons against the Aged-Control group; ϕ denotes $p < 0.05$ using Tukey's test comparing the LLLT – exercise group with the Aged-LLLT group and exercise group.

Figure 2. Comparison of the mean and standard deviation the activity of the Catalase enzyme (CAT) in the gastrocnemius muscle of the young and aged animals. Panel A, represents the activity of the enzyme CAT after 6 weeks of aerobic training through swimming, where * denotes $p < 0.05$ and ** denotes $p < 0.001$, using Tukey's test with comparisons against the Young-Control group; # denotes $p < 0.05$ and ## denotes $p < 0.001$ using Tukey's test with comparisons against the Aged-Control group; ϕ denotes $p < 0.05$ using Tukey's test comparing the LLLT – exercise group with the Aged-LLLT group and exercise group and λ $p < 0.05$ using Tukey's test comparing the LLLT group vs exercise group. The Panel B , represents the perceptual increased activity of the enzyme relative to the control group Aged.

Figure 3. Comparison of the mean and standard deviation the activity of the Superoxide Dismutase (SOD) in the gastrocnemius muscle of the Young and Aged animals. Panel A represents the activity of the SOD after 6 weeks of aerobic training through swimming, where * denotes $p < 0.05$ and, using Tukey's test with comparisons against the Young-Control group; # denotes $p < 0.05$ and ## denotes $p < 0.001$ using Tukey's test with comparisons against the Aged-Control group; ϕ denotes $p < 0.05$ using Tukey's test comparing the LLLT – exercise group with the Aged-LLLT group and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

exercise group. The Panel B , represents the perceptual increased activity of the enzyme relative to the control group Aged.

Figure 4. Comparison of the mean and standard deviation the activity of the Glutathione Peroxidase (GPx) in the gastrocnemius muscle of the young and aged animals. Panel A represents the activity of the GPx after 6 weeks of aerobic training through swimming, where * denotes $p < 0.05$ and, using Tukey's test with comparisons against the Young-Control group; # denotes $p < 0.05$ and # # denotes $p < 0.001$ using Tukey's test with comparisons against the Aged-Control group; ϕ denotes $p < 0.05$ using Tukey's test comparing the LLLT – exercise group with the Aged-LLLT group and exercise group.

Figure 5. Comparison of the mean and standard deviation the concentrations the Thiobarbituric Acid (TBARS) in the gastrocnemius muscle of the young and aged animals. Panel A represents the concentrations the TBARS after 6 weeks of aerobic training through swimming, where ** denotes $p < 0.01$ and, using Tukey's test with comparisons against the Young-Control group; # denotes $p < 0.05$ and # # denotes $p < 0.001$ using Tukey's test with comparisons against the Aged-Control group; ϕ denotes $p < 0.05$ using Tukey's test comparing the LLLT – exercise group with the Aged-LLLT group and exercise group.

The low-level laser therapy (LLLT) in oxidative stress and on the functional fitness of elderly rats Subjected to aerobic training for swimming

Simone A. Guaraldo¹; Andrey Jorge Serra² Eliane Martins Amadio²; Ednei Luis Antônio³, Flávio Silva³, Leslie Andrews Portes³, Paulo José Ferreira Tucci³, José Antonio Silva Junior¹; Ernesto C. Leal-Junior^{1,2} and Paulo de Tarso Camillo de Carvalho^{1,2}

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

²Postgraduate Program in Biophotonics Applied Health Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE) São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Cardiology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil

Please address reprint requests and all correspondence to:

Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), Rua Vergueiro 235, São Paulo, SP, Brazil

Phone number: +55 19 99290262

Fax number: +55 11 33859000

E-mail: paulo.tarso@uninove.br

Table

[Click here to download Table: Table 1.doc](#)

Table 1. Summary of the laser parameters.

Wave length (nm)	Output power (mW)	Power density (W/cm ²)	Laser beam (cm ²)	Energy density (J/cm ²)	Energy per point (J)	Irradiation time per point (sec)
808	100	1.071	0.028	144	4	40

Figure 1.
[Click here to download high resolution image](#)

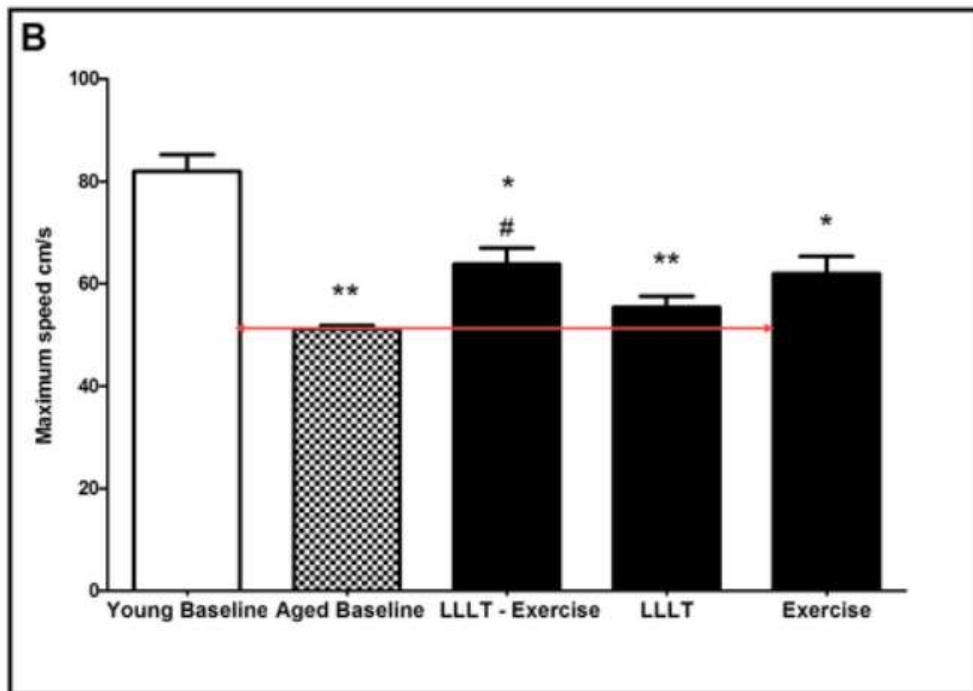
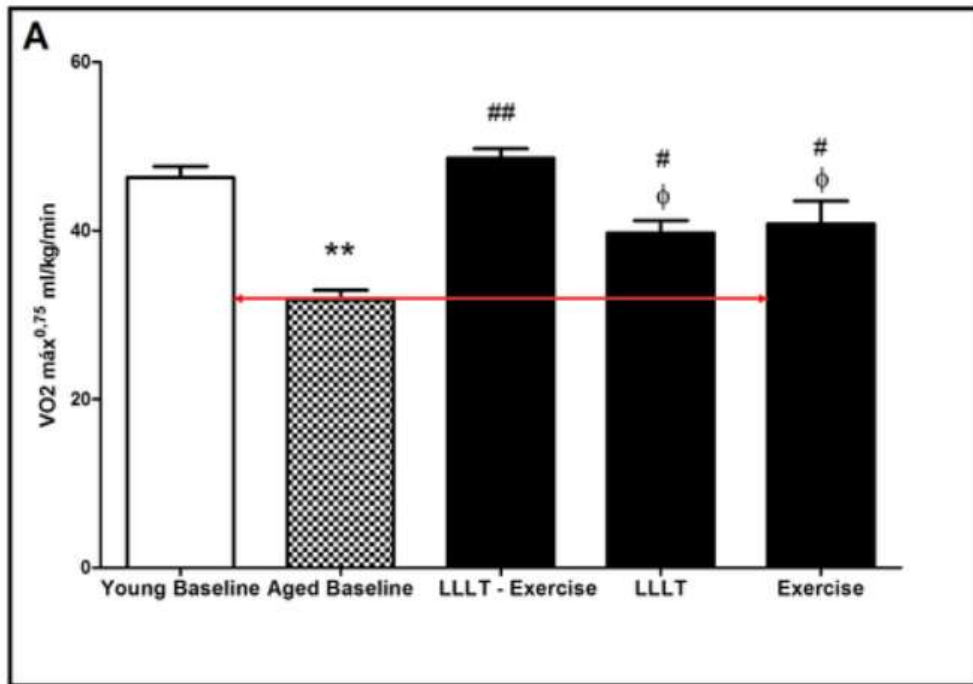


Figure 2.
[Click here to download high resolution image](#)

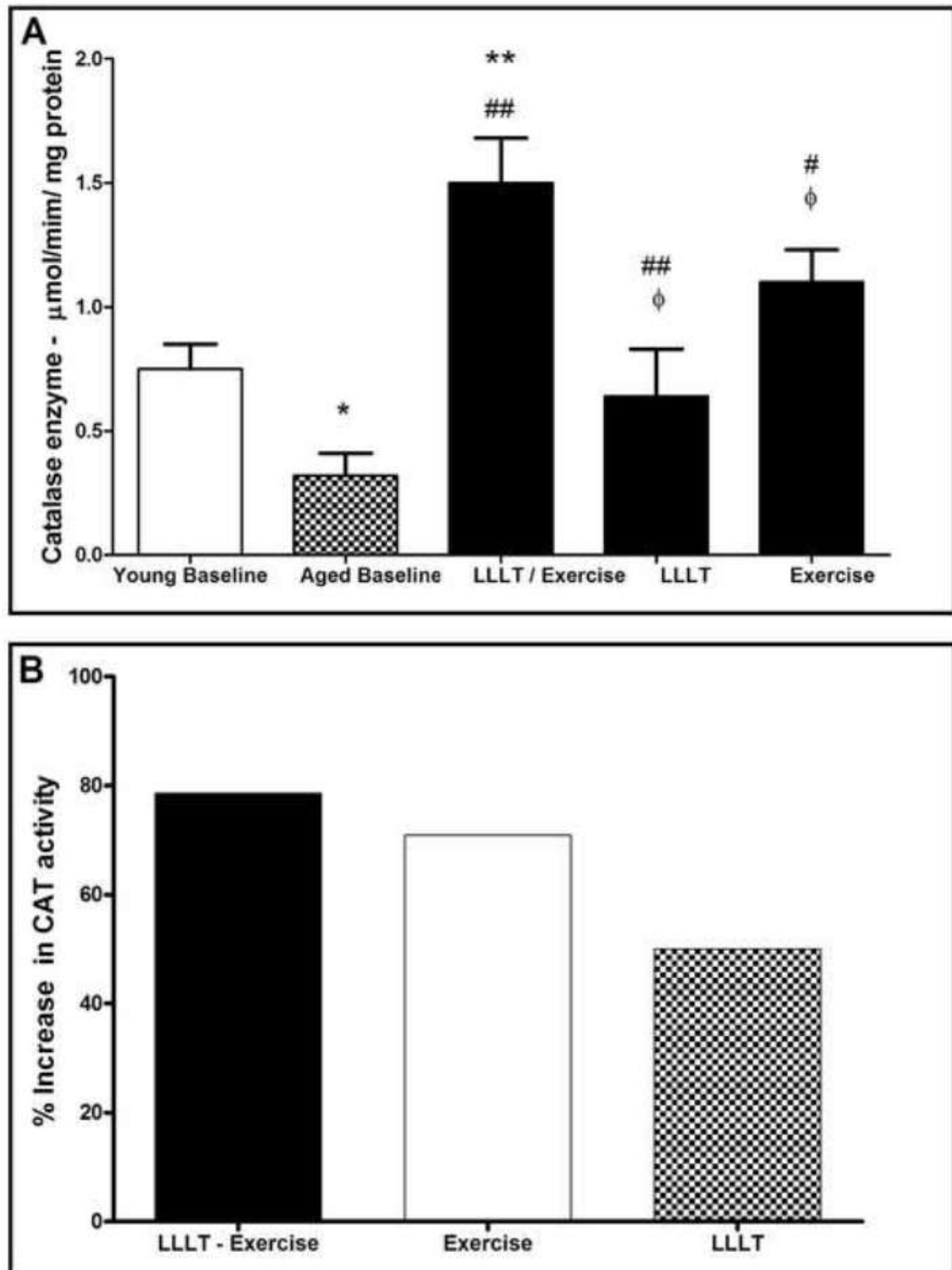


Figure 3.
[Click here to download high resolution image](#)

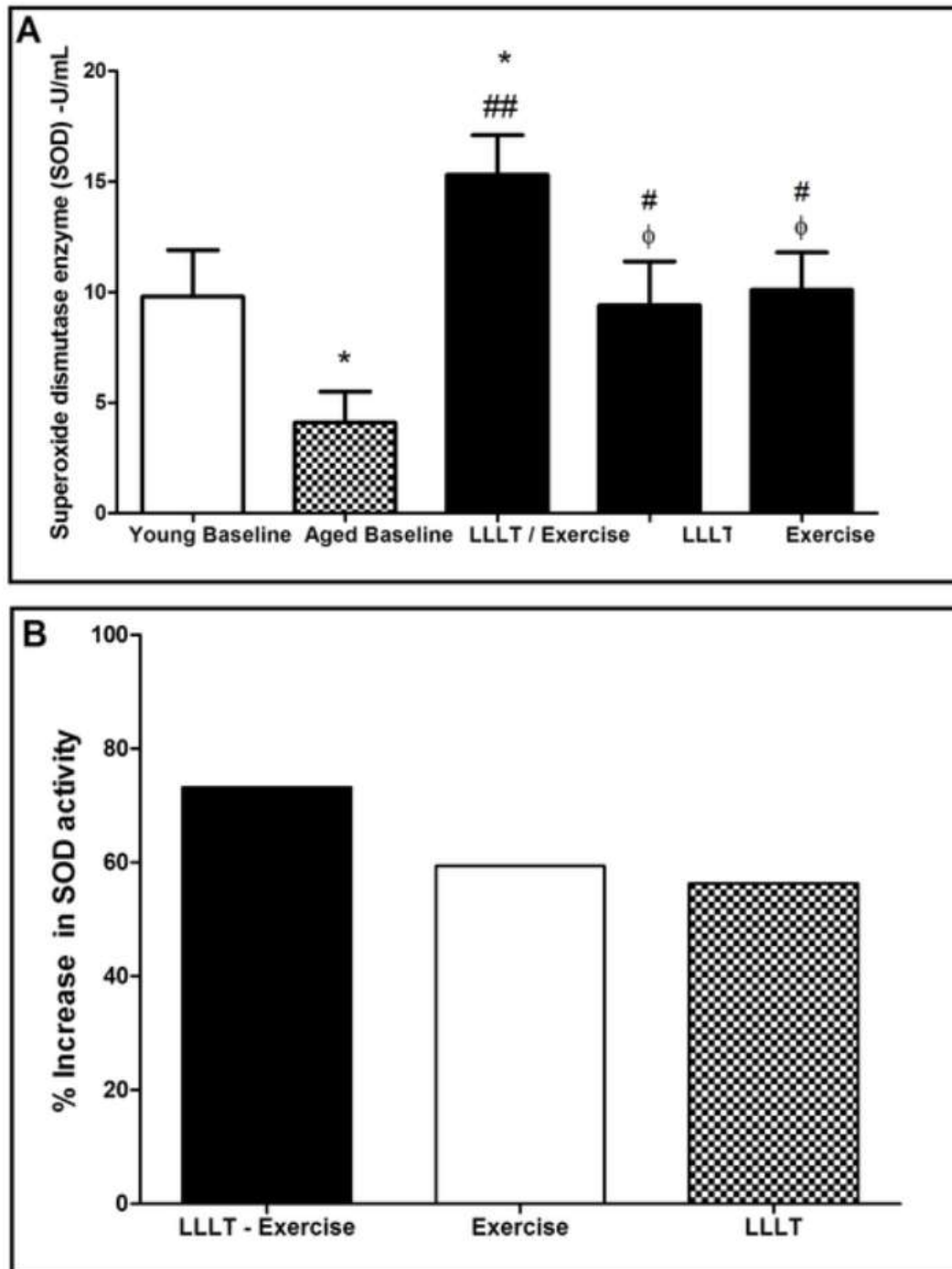


Figure 4.
[Click here to download high resolution image](#)

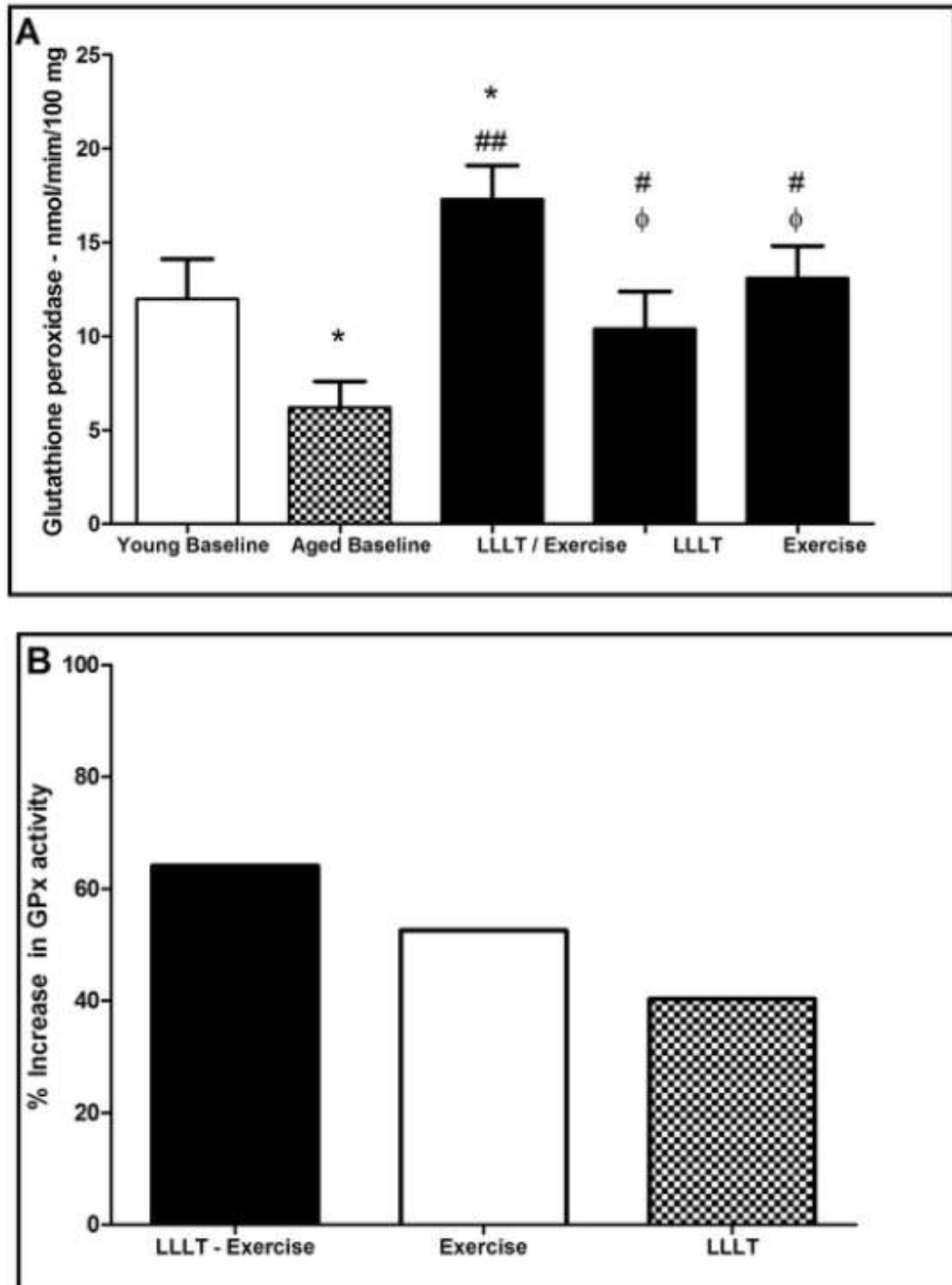
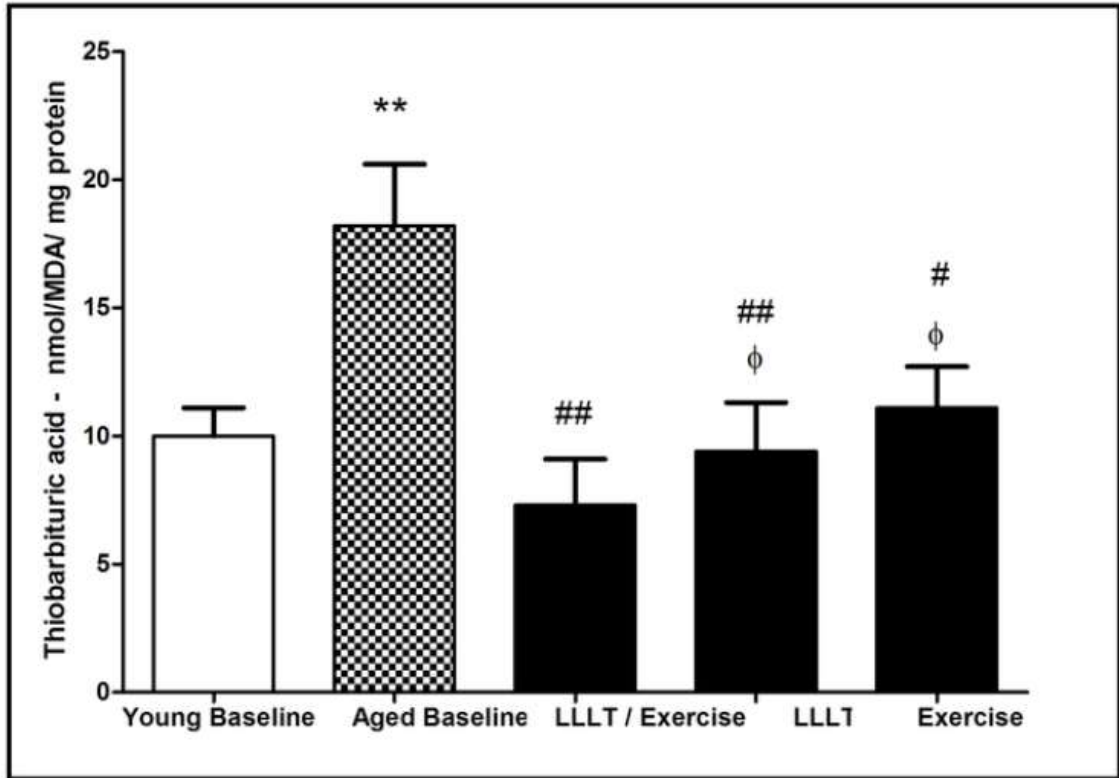


Figure 5.
[Click here to download high resolution image](#)



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como eixo balisador dois pontos: O envelhecimento está ligado à presença de estresse oxidativo e a literatura indica a exercício físico aeróbica para melhorar a função cardio-respiratória em idosos bem como no controle de doenças crônicas, comum durante ao envelhecimento tais como hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus. No entanto, há controvérsia na literatura sobre o papel do exercício físico no estresse oxidativo. De acordo com vários estudos, o Laser de Baixa Potência reduz marcadores de estresse oxidativo e melhora as defesas antioxidantes em várias circunstâncias clínicas e experimentais, bem como estudos recentes têm mostrado que a laserterapia tem melhorado desempenho físico de atletas além de diminuir fadiga muscular. Levantamos a hipótese, no presente estudo de que o Laser de baixa potência em conjunto com o treinamento aeróbio pode ser uma abordagem eficaz para reduzir marcadores de estresse oxidativo, no músculo esquelético; e a possibilidade de que a Laser de baixa potência associado ao treinamento de natação poderia melhorar o desempenho funcional de ratos idosos.

Para tanto realizamos neste estudo uma avaliação do VO_{2max} baseado na pontuação alométrica que é a medida do VO_{2max} usando a proporção de massa corporal / magra. Nossos resultados apontam para melhora no desempenho aeróbio com o Laser de baixa potência associado ao exercício de natação em ratos idosos. Este grupo (LBP / exercício) apresentou resultados de maior aumento de $VO_{2max}^{0,75}$ do que os outros grupos, fazendo com que os valores de $VO_{2max}^{0,75}$ ficasse superior aos animais jovens controle, isto foi suficiente para causar diferença estatística em comparação ao grupo que só foi treinado (grupo de exercício) e LBP.

Nossos resultados corroboram com a literatura considerando que a comparação entre os valores dos jovens e idosos grupos controle foram $VO_{2max}^{0,75}$ superiores em animais jovens, no entanto, nossos resultados demonstraram um aumento significativo no grupo LBP e grupos de exercício (apenas treinamento físico para a natação).

No presente também observamos a atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) e biomarcadores de peroxidação lipídica (TBARS) e observamos que o grupo com idoso controle apresentou concentração de TBARS maior que os exercício (treinado), grupo LBP e LBP mais exercício (treinado) que indica redução da peroxidação lipídica na membrana da fibra muscular do músculo dos animais do grupo de intervenção. Verificamos também que

associação do LBP ao exercício também foi capaz de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx), no músculo gastrocnêmio de ratos idosos.

O sistema de defesa antioxidante foi melhorado no músculo gastrocnêmio dos animais com idosos submetidos à irradiação com LBP associada com o treinamento aeróbio, quando comparados com ratos idosos (grupo exercício, grupo LBP e grupo idoso controle). Estes resultados nos permitem concluir que o exercício físico regular mais o Laser de baixa potência pode ser importante estratégia para combater a produção suprafisiológica de EROs, uma vez que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica reduziu no músculo gastrocnêmio. Estas descobertas podem ter influenciado, pelo menos parcialmente, o aumento de $VO_{2max}^{.75}$ dos animais idosos.

7. REFERÊNCIAS

1. ABELLAN, VAN KAN, G. Epidemiology and consequences of sarcopenia. **J Nutr Health Aging**. 2009 Oct;13(8):708-12.
2. ALBERTINI, R.; MORATTI, R.; DE LUCA, G. Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies. **Curr Mol Med**. 2002 Sep; 2 (6):579-92. Review.
3. ALLEN, D.G.; LAMB, G.D.; WESTERBLAD, H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. **Physiol Rev**. 2008 Jan;88(1):287-332. Review.
4. ANAND, V.; GULATI, M.; GOVILA, V.; ANAND, B. Low level laser therapy in the treatment of aphthous ulcer. *Indianas* **J Dent Res**. 2013 Mar-abril; 24 (2):267-70. doi: 10.4103/0970-9290.116691.
5. ANKRI, R.; FRIEDMAN, H.; SAVION, N.; KOTEV-EMETH, S.; BREITBART, H.; LUBART, R. Visible light induces nitric oxide (NO) formation in sperm and endothelial cells. **Lasers Surg Med**. 2010 Apr;42(4):348-52. doi: 10.1002/lsm.20849.7
6. APPLEROT, G.; LELLOUCHE, J.; LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; LUBART, R.; GEDANKEN, A.; BANIN, E. Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress. **Small**. 2012 Nov 5;8(21):3326-37. doi: 10.1002/sml.201200772.
7. AVNI, D.; LEVKOVITZ, S.; MALTZ, L. Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. **Photomed Laser Surg**. 2005 23(3): 273-277.
8. BARBOSA, K.B.F.; COSTALL, N.M.B.; ALFENASLL, R.C.G.; DE PAULALL, S.O.; MINIMIV, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev.Nutr**. vol.23 no.4 Campinas July/Aug. 2010
9. BASSO, F.G.; PANSANI, T.N.; TURRIONI, A.P.; BAGNATO, V.S.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. In vitro wound healing improvement by_low-level laser therapy_application in cultured gingival fibroblasts. **Int J Dent**. 2012;2012:719452.
10. BENONI, G.; BELLAVITE, P.; ADAMI, A.; CHIRUMBOLO, S.; LIPPI, G.; BROCCO, G.; CUZZOLIN, L. Effect of acute exercise on some hematological parameters and neutrophil functions in active and inactive subjects. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v.70, n.2, p.187-191, 1995

11. BORSA, P.A.; LARKIN, K.A.; TRUE, J.M. Does phototherapy enhance skeletal muscle contractile function and postexercise recovery? A systematic review. **J Athl Train.** 2013 Jan-Feb;48(1):57-67. doi: 10.4085/1062-6050-48.1.12.
12. DE MOFFARTS, B.; KIRSCHVINK, N.; ART, T.; PINCEMAIL, J.; MICHAUX, C.; CAYEUX, K.; DEFRAIGNE, J.O.; LEKEUX, P. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. **Equine and Comparative Exercise Physiology** 1(3); 211–220.
13. BROOKS, G. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. **Journal of Physiology**, v.587, n.23, p.5591- 5600, 2009.
14. CALLAHAN, D.M.; KENT-BRAUN, J.A. Effect of old age on human skeletal muscle force-velocity and fatigue properties. **J Appl Physiol** (1985). 2011 Nov; 111(5):1345-52. doi: 10.1152/jappphysiol.00367.2011.
15. CAMÕES, B.A.; SIMÕES, H.; LORGA, S.; MENDES, M. Low-level LBI therapy in the treatment of diabetic ulcers: an evidence problem. **Acta Med Port.** 2011 Dec ;24 Suppl 4:875-80.
16. CHARIFI, N.; KADI, F.; FÉASSON, L.; DENIS, C. Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men. **Muscle Nerve.** 2003 Jul;28(1):87-92.
17. CHEVION, S.; MORAN, D.S.; HELED, Y.; SHANI, Y.; REGEV, G.; ABOU, B.; BERENSHTEIN, E., STADTMAN, E.R.; EPSTEIN, Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Apr 29;100(9):5119-23.
18. CHILDS, A.; JACOBS, C.; KAMINSKI, T.; HALLIWELL, B.; LEEUWENBURGH, C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. **Free Radic Biol Med.** 2001 Sep 15;31(6):745-53.
19. CHUNG, H.Y.; CESARI, M.; ANTON, S.; MARZETTI, E.; GIOVANNINI, S.; SEO, A.Y.; CARTER, C.; YU, B.P.; LEEUWENBURGH, C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. **Ageing Res Rev.** 2009 Jan; 8 (1): 18-30 .

20. CIPRIANI, N.C.S.; MEURER, S.T.; BENEDETTI, T.R.B.; LOPES, M.A. Aptidão funcional de idosas praticantes de atividades físicas. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum** 2010;12(2):106-111.
21. CLOSE, G.L.; ASHTON, T.; CABLE, T.; DORAN, D.; NOYES, C.; MCARDLE, F.; MACLAREN, D.P. Effects of dietary carbohydrate on delayed onset muscle soreness and reactive oxygen species after contraction induced muscle damage. **Br J Sports Med.** 2005 Dec;39(12):948-53.
22. COOPER, D. M.; RADOM-AIZIK, S.; SCHWINDT, C.; ZALDIVAR JR., F. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. **Journal of Applied Physiology**, v.103, p.700-709, 2007.
23. CRUZAT, V. F.; PETRY E R.; TIRAPEGUI J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v.13, n.5, Set/Out 2007.
24. DE ALMEIDA, P; LOPES-MARTINS, R.Á.; TOMAZONI, S.S.; SILVA, J.A. JR.; DE CARVALHO, P. DE T.; BJORDAL, J.M.; LEAL JUNIOR, E.C. Low-level LBI therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. **Photochem Photobiol.** 2011 Sep-Oct;87(5):1159-63. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00968.x.
25. DE ALMEIDA, P.; LOPES-MARTINS, R.A.; DE MARCHI, T.; TOMAZONI, S.S.; ALBERTINI, R.; CORRÊA, J.C.; ROSSI, R.P.; MACHADO, G.P.; DA SILVA, D.P.; BJORDAL, J.M.; LEAL JUNIOR, E.C. Red (660 nm) and infrared (830 nm) low-level LBI therapy in skeletal muscle fatigue in humans: what is better? **Laser Med Sci.** 2012 Mar;27(2):453-8. doi: 10.1007/s10103-011-0957-3.
26. DE MARCHI, T.; LEAL JUNIOR, E.C.; BORTOLI, C.; TOMAZONI, S.S.; LOPES-MARTINS, R.A.; SALVADOR, M. Low-level LBI therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Laser Med Sci.** 2012 Jan;27(1):231-6. doi: 10.1007/s10103-011-0955-5.
27. DRÖDGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews.** v.82. p.47-95, 2002.

28. ENWEMEKA, C.S.; PARKER, J.C.; DOWDY, D.S.; HARKNESS, E.E.; SANFORD, L.E.; WOODRUFF, L.D. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed Laser Surg.** 2004;22(4):323–329.
29. FARAGE, M.A.; MILLER, K.W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H.I. Characteristics of the Aging Skin. **Adv Wound Care** (New Rochelle). 2013 Feb;2(1):5-10.
30. FERRARESI, C.; DE BRITO, O.T.; DE OLIVEIRA, Z.L.; DE MENEZES, R.R.B.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE, P.S.E.; MATHEUCCI, J.E.; PARIZOTTO, N.A. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. **Lasers Med Sci.** 2011 May;26(3):349-58. doi: 10.1007/s10103-010-0855-0.
31. FILLIPIN, L.I.; MAURIZ, J.L.; VEDOVELLI, K.; MOREIRA, A.J.; ZETTLER, C.G.; LECH, O.; MARRONI, N.P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibroses en rat traumatized Achilles tendon. **Lasers Surg Med.** 2005; 37:293–300.
32. GEMMA, C.; VILA, J.; BASCHSTETTER, A.; BICKFORD, O.C. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In: Riddle DR, editor. **Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms.** Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3869/>
33. GIBSON, M.C.; SCHULTZ, E. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. **Anat Rec** 1982;202:329-337.
34. GRANOT, E.; KOHEN, R. Oxidative stress in childhood in health and disease states. **Clin Nutr.** 2004 Feb;23(1):3-11.
35. HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.** 2004 May;142(2):231-55.
36. HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology.** 1956;11:298-300.
37. HARMAN, D. The biologic clock: the mitochondria? **J Am Geriatr Soc.** 1972; 20:145.

38. HAWKING, H.D.; ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblast. **Photomed Laser Surg.** 24(6): 705-714, 2006.
39. HOPP, J.F. Effects of age and resistance training on skeletal muscle: a review. **Phys Ther.** 1993 Jun;73(6):361-73.
40. HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Irradiation with a 632.8 nm helium-neon LBI with 5 J/cm² stimulates proliferation and expression of interleukin-6 in diabetic wounded fibroblast cells. **Diabetes Technol Ther.** 2007 Oct;9(5):451-9.
41. HUANG, Y.Y.; CHEN, A.C.; CARROLL, J.D.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**; 2009; 7:358–383
42. IHSAN, F.R. Low-level LBI therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. **Photomed Laser Surg.** 2005 Jun;23(3):289-94.
43. JACKSON, M.J. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function. **Free Radical Biology & Medicine**, v.44, p.132-141, 2008.
44. JACOBS, R.A.; DONOVAN, E.L.; ROBINSON, M.M. Parallels of snipe hunting and ROS research: the challenges of studying ROS and redox signalling in response to exercise. **J Physiol.** 2009 Mar 1;587(Pt 5):927-8.
45. JAVESHGHANI, D.; MAGDER, S.A.; BARREIRO, E.; QUINN, M.T.; HUSSAIN, S.N. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. **Am J Respir Crit Care Med.** 2002 Feb 1;165(3):412-8.
46. JI, L. L., GOMEZ-CABRERA, M. C.; VINA, J. Exercise and hormesis; Activation of cellular antioxidant signaling pathway. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1067, p.425-435, 2006.
47. KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B.** 1999;49(1):1–17
48. KARU, T. High-tech helps to estimate cellular mechanisms of low power laser therapy. **Lasers Surg Med.** 2004;34(4):298-9.
49. KENT-BRAUN, J.A. Skeletal muscle fatigue in old age: whose advantage? **Exerc Sport Sci. Rev.** 2009 Jan;37(1):3-9.
50. KORHONEN, M.T.; CRISTEA, A.; ALÉN, M.; HÄKKINEN, K.; SIPILÄ, S.; MERO, A.; VIITASALO, J.T.; LARSSON, L.; SUOMINEN, H. Aging, muscle fiber type, and

- contractile function in sprint-trained athletes. **J Appl Physiol** (1985). 2006 Sep;101(3):906-17. Epub 2006 May 11.
51. LEAL JUNIOR, E.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; DALAN, F.; FERRARI M.; SBABO, F.M.; GENEROSI, R.A.; BARONI, B.M.; PENNA, S.C.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of 655-nm low-level LBI therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Photomed Laser Surg.** 2008 Oct;26(5):419-24. doi: 10.1089/pho.2007.2160.
52. LEAL JUNIOR, E.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; VANIN, A.A.; BARONI, B.M.; GROSSELLI, D.; DE MARCHI, T.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Laser Med Sci.** 2009 May;24(3):425-31. doi: 10.1007/s10103-008-0592-9. Epub 2008 Jul 23.
53. LEAL, E.C. JUNIOR.; LOPES-MARTINS, R.A.; DE ALMEIDA, P.; RAMOS, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **Eur J Appl Physiol.** 2010; 108(6):1083–8.
54. .LEKHI, C.; GUPTA, P.H.; SINGH, B. Influence of exercise on oxidant stress products in elite Indian cyclists. **Br J Sports Med.** 2007 Oct;41(10):691-3.
55. LIU, X.G.; ZHOU, Y.J.; LIU, T.C.; YUAN, J.Q. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. **Photomed Laser Surg.** 2009; 27(6):863–9.
56. LOPES-MARTINS, R.A.; MARCOS, R.L.; LEONARDO, P.S.; PRIANTI, A.C. JR.; MUSCARÁ, M.N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol.** 2006; 101(1):283–8.
57. LUBART; R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMAN, H.; SHAINBERG, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. **Photomed Laser Surg** 2005 23:3–9
58. MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. **Free Radic Biol Med.** 2001 Oct 1;31(7):911-22.

59. MATSUDO, S.M.; MATSUDO, V.K.R.; BARROS NETO, T.L. Atividade física e envelhecimento: aspectos epidemiológicos. **Rev Bras Med Esporte, Niterói**, v. 7, n. 1, 2001.
60. Mc ANULTY, S.R.; MCANULTY, L.S.; NIEMAN, D.C.; MORROW, J.D.; UTTER A.C.; DUMKE, C.L. Effect of resistance exercise and carbohydrate ingestion on oxidative stress. **Free Radic Res.** 2005 Nov;39(11):1219-24.
61. MCARDLE, A.; VASILAKI, A.; JACKSON, M. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. **Ageing Res Rev.** 2002 Feb;1(1):79-93.
62. MCARDLE, A.; JACKSON, M.J. Exercise, oxidative stress and ageing. **J Anat.** 2000 Nov;197 Pt 4:539-41.
63. MCARDLE, A.; VASILAKI, A.; JACKSON, M. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. **Ageing Res Rev.** 2002 Feb;1(1):79-93.
64. METIN, G.; ATUKEREN, P.; ALTURFAN, A.A.; GULYASAR, T.; KAYA, M.; GUMUSTAS, M.K. Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals in young male footballers. **Yonsei Med J.** 2003 Dec 30;44(6):979-86.
65. METIN, G.; GÜMÜŞTAŞ, M.K.; BELCE, A.; KAYSERILIOGLU, A. The effect of regular swimming exercise on vitamin E supplemented male rats. **Arch Physiol Biochem.** 2003 Jul;111(3):215-6.
66. MORLEY, J.E.; BAUMGARTNER, R.N.; ROUBENOFF, R.; MAYER, J.; NAIR, K.S. Sarcopenia. **J Lab Clin Med.** 2001 Apr;137(4):231-43.
67. MORLEY, J.E. Anorexia, sarcopenia, and aging. **Nutrition.** 2001;17:660–663.
68. NAM, H.S.; PARK, D.S.; KIM, D.H.; KANG, H.J.; LEE, D.H.; LEE, S.H.; HER, J.G.; WOO, J.H.; CHOI, S.Y. The relationship between muscle fatigue and balance in the elderly. **Ann Rehabil Med.** 2013 Jun;37(3):389-95.
69. NARICI, M.V.; MAFFULLI, N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. **Br Med Bull.** 2010;95:139-59.
70. NELSON, M. E. et al. Physical Activity and Public Health in Older Adults: Recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1435-1445, 2007.
71. NILWIK, R.; SNIJDERS, T.; LEENDERS, M.; GROEN, B.B.; VAN KRANENBURG, J.; VERDIJK, L.B.; VAN LOON, L.J. The decline in skeletal muscle mass with aging

- is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. **Exp Gerontol.** 2013 May;48(5):492-8.
72. NONES, J.; STIPURSKY, J.; COSTA, S.L.; GOMES, F.C. Flavonoids and astrocytes crosstalking: implications for brain development and pathology. **Neurochem Res.** 2010 Jul;35(7):955-66.
73. OLIVEIRA, A.R.; SCHNEIDER, C.D.; RIBEIRO, J.L.; DERESZ, L.F.; BARP, J.; BELLÓ-KLEIN, A. Oxidative stress after three different intensities of running. **Med Sci Sports Exerc.** 2004; 35:S367.
74. PAGÈS, J.C.; GAILLOUD-MATTHIEU, M.C.; EGLOFF, D.V. Principles of physics and application of the laser in plastic surgery. **Rev Med Suisse Romande.** 1999 Sep;119(9):739-42.
75. PETRELLA, J.K.; KIM, J.S.; MAYHEW, D.L.; CROSS, J.M.; BAMMAN, M. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in human is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. **J Appl Physiol** 2008; 104:1736-1742.
76. PINHO, R.A.; ANDRADES, M.E; OLIVEIRA, M.R.; PIROLA, A.C.; ZAGO, M.S.; SILVEIRA, P.C.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol Int.** 2006 Oct;30(10):848-53.
77. POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev.** 2008 Oct; 88(4):1243-76.
78. POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Med Sci Sports Exerc.** 1999 Jul;31(7):987-97.
79. QUADILÁTERO, J.; BOMBARDIER, E.; NORRIS, S. M.; TALANIAN, J. L.; PALMER, M. S.; LOGAN, H. M.; TUPLING, A. R.; HEIGENHAUSER, G. J. F.; SPRIET, L. L. Prolonged moderate intensity aerobic exercise does not alter apoptotic signaling and DNA fragmentation in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.298, p.E534-E547, 2010.

80. RAMEL, A.; WAGNER, K.H.; ELMADFA, I. Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. **Eur J Nutr.** 2004 Feb;43(1):2-6. Epub 2004 Jan 6.
81. RAO, A.; LUO, C.; HOGAN, P.G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. **Annu. Rev Immunol** 1997;15:707-747.
82. RIZZI, C.F.; MAURIZ, J.L.; FREITAS CORRÊA, D.S.; MOREIRA, A.J.; ZETTLER, C.G.; FILIPPIN, L.I.; MARRONI, N.P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Effects of low-level lasertherapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers Surg Med.** 2006 Aug;38(7):704-13.
83. ROMANO A.D, SERVIDDIO G, DE MATTHAEIS A, BELLANTIF, VENDEMIALE G. Oxidative stress and aging. **J Nephrol.** 2010 Sep-Oct;23 Suppl 15:S29-36.
84. ROSA, M.F.; MAZO, G.Z; SILVA, A.H.; BRUST, C. Efeito do período de interrupção de atividades aquáticas na aptidão funcional de idosas. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum** 2008;10(3):237-42.
85. SANKARAPANDI, S.; ZWEIER, J.L. Evidence against the generation of free hydroxyl radicals from the interaction of copper,zinc-superoxide dismutase and hydrogen peroxide. **J Biol Chem.** 1999 Dec 3;274(49):34576-83.
86. SCHIAFFINO,S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **J Appl Physiol** 1994; 77:493-501.
87. SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte.** 2004, vol.10, n.4, pp. 308-313. ISSN 1517-8692.
88. SEM, C.K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **Am J Clin Nutr.** 2000 Aug;72(2 Suppl):653S-69S. Review.
89. SERVETTO, N.; CREMONEZZI, D.; SIMES, J.C. Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. **Lasers Surg Med.** 2010, 42(6): 577–83
90. SILVA, T.A.A.; FRISOLI, JR..A.; PINHEIRO, M.M.; SZEJNFELD, V.L. Sarcopenia and aging: aspects and therapeutic options. **Rev Bras Reumatol** 2006;46(6):391-7.
91. SILVA, V.C.C. O efeito do laser de baixa potência (658nm) na reparação tecidual de queimaduras de terceiro grau em ratos Wistar. 2006. Dissertação (Mestrado em

Bioengenharia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

92. SILVEIRA, P.C.; SILVA, L.A.; FRAGA, D.B.; FREITAS, T.P.; STRECK, E.L.; PINHO, R.. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol.** 2009, B 95: 89-92.
93. SILVEIRA, L.R. Critical and methodological analyses on the determination of oxygen and nitrogen reactive species in skeletal muscle cells during contractions. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** 2004 Dec;48(6):812-22. Epub 2005 Mar 8. Review.
94. STEIN, A.; BENAYANU, D.; MALTZ, L. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg** 2005 Apr;23(2):161-6.
95. SUSSAI, D.A.; CARVALHO, P.DE T.; DOURADO, D.M., BELCHIOR, A.C.; DOS REIS, F.A.; PEREIRA, D.M. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. **Laser Med Sci.** 2010 Jan;25(1):115-20. doi: 10.1007/s10103-009-0697-9. Epub 2009 Jun 25.
96. TAKEDA, N.; NAKAMURA, I.; OHKUBO, T.; HATANAKA, T.; NAGANO, M. Effects of physical training on the myocardium of streptozotocin-induced diabetic rats. **Basic Res Cardiol.** 1988 Sep-Oct;83(5):525-30.
97. TEIXEIRA, M.J. Challenges in the treatment of neuropathic pain. **Drugs Today (Barc).** 2009 Oct;45 Suppl C:1-5. Portuguese.
98. TELES, M.; MACHADO, F. A. A influência do exercício físico e dos sistemas antioxidantes na formação de radicais livres no organismo humano. *Revista de Saúde e Biologia*, v. 3, n.1, p.40-49, Jul-Dez, 2008.
99. TOMA, R.L.; TUCCI, H.T.; ANTUNES, H.K.; PEDRONI, C.R.; DE OLIVEIRA, A.S.; BUCK, I.; FERREIRA, P.D.; VASSÃO, P.G.; RENNO, A.C. Effect of 808 nm low-level LBI therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in elderly women. **Laser Med Sci.** 2013 Sep;28(5):1375-82. doi: 10.1007/s10103-012-1246-5.
100. TONKONOGLI, M.; WALSH, B.; SVENSSON, M.; SAHLIN, K. Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. **J Physiol.** 2000 Oct 15;528 Pt 2:379-88

101. TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. **Lasers Surg Med.** 39(4): 373-378, 2007.
102. TULLBERG, M.; ALSTERGREN, P.J.; ERNBERG, M.M. Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. **Pain**105, 89-96. 2003
103. URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology.** 2003 Jul 15;189(1-2):41-54.
104. VANCINI, R.L.; LIRA, C.A.B.; ABOULAFIA, J. NOUAILHETAS, V.L.A. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. **Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício UNIFESP.** São Paulo, 2005.
105. VASSILAKOPOULOS, T.; DECKMAN, G.; KEBBEWAR, M.; RALLIS, G.; HARFOUCHE, R.; HUSSAIN, S.N. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2003 Mar;284(3):L452-7.
106. VIEIRA JUNIOR, R.C.; SILVA, C.M.S.; DE ARAÚJO, M.B.; GARCIA, A.; VOLTARELLI, V.A.; REIS FILHO, A.D. Treinamento aeróbio de natação aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de glicogênio no musculoesquelético de ratos. **Rev Bras Med Esporte** . 2013 June ; 19(3): 204-208.
107. VIEIRA, W.H.B.; GOES, R.; COSTA, F.C.; PARIZOTTO, N.A.; PEREZ, S.E.A.; BALDISSERA, V.; MUNIN, F.S.; SCHWANTES, M.L.B. Adaptation of LDH enzyme in rats undergoing aerobic treadmill training and low intensity laser therapy. **Ver Bras Fisioter.** 2006; 10(2):205–211.
108. VIEIRA, W.H.; FERRARESI, C.; PEREZ, S.E.; BALDISSERA, V.; PARIZOTTO, N.A.. Effects of low-level LBI therapy (808 nm) on isokinetic muscle performance of young women submitted to endurance training: a randomized controlled clinical trial. **Laser Med Sci.** 2012 Mar;27(2):497-504. doi: 10.1007/s10103-011-0984-0.
109. VIEIRA, W.H.B.; GOES, R.; COSTA, F.C.; PARIZOTTO, N.A.; PEREZ, S.E.A.; BALDISSERA, V.; MUNIN, F.S.; SCHWANTES, M.L.B. Adaptation of LDH enzyme in rats undergoing aerobic treadmill training and low intensity laser therapy. **Rev Bras Fisioter.** 2006; 10(2):205–211.

110. VIITALA, P.; NEWHOUSE, I.; LAVOIE, N.; GOTTARDO, C. The effects of antioxidant Vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. **Lipids Health Dis**, v.3, n.14, p.1-9, 2004.
- VIÑA RIBES, J. Deporte de alta competición y daño oxidativo: papel de los nutrientes antioxidantes. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, Vol. 21, Nº 5, 2001, pags. 190-201.
111. WESTERBLAD, H.; BRUTON, J.D.; KATZ, A. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. **Exp Cell Res**. 2010 Nov 1;316(18):3093-9. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.05.019.
112. WISLOFF, U.; BRUBAKK, A.O. Aerobic endurance training reduces bubble formation and increases survival in rats exposed to hyperbaric pressure. **J Physiol**. 2001 December 1; 537(Pt 2): 607–611.
113. Xu, X.; Zhao, X.; Liu, T.C.; Pan, H. 2008. Low-intensity laser irradiation improves the mitochondrial dysfunction of C2C12 induced by electrical stimulation. **Photomed Laser Surg** 26: 197-202.
114. ZOPPI, C.C.; ANTUNES, N.J.; CATANHO, F.O.; GOULART, L.F.; MOURA, N.M.; MACEDO, D.V.. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev. paul. Educ. Fís.**, São Paulo, 17(2): 119-30, jul./dez. 2003.