



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

**SOLANGE ALMEIDA DOS SANTOS**

**Terapia de fotobiomodulação associada ao exercício físico no  
estresse oxidativo em modelo experimental de artrite reumatoide  
induzida por colágeno**

**São Paulo, SP**  
**2016**

**SOLANGE ALMEIDA DOS SANTOS**

**Terapia de fotobiomodulação associada ao exercício físico no  
estresse oxidativo em modelo experimental de artrite reumatoide  
induzida por colágeno**

Projeto de Pesquisa apresentado ao  
programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Reabilitação aplicada às  
Ciências da Saúde da Universidade  
Nove de Julho para defesa de  
mestrado

**Orientador:** Profº Drº Paulo de  
Tarso Camillo de Carvalho

**São Paulo, SP**

**2016**

Santos, Solange Almeida dos.

Terapia de fotobiomodulação associada ao exercício físico no estresse oxidativo em modelo experimental de artrite reumatóide induzida por colágeno. / Solange Almeida dos Santos. 2016.

58 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

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

I. Fotobiomodulação. 2. Artrite reumatóide. 3. Estresse oxidativo. 4. Exercício físico. 5. Expressão proteica.

I. Carvalho, Paulo de Tarso Camillo de. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 19 de dezembro de 2016.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno(a): Solange Almeida dos Santos

Título da Dissertação: "Terapia de fotobiomodulação associada ao exercício físico no estresse oxidativo em modelo experimental de artrite reumatoide induzida por colágeno".


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



Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR



Membro: PROF. DR. LUCIO FRIGO



## **DEDICATÓRIA**

Dedico todo meu esforço e dedicação aos meus pais: Antonio e Valdelice.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, fonte da minha força e persistência. À minha família: Pais, irmãos, sobrinhos, amigos. Por terem sido tantas vezes meu suporte e torcida. Aos amigos de longa data, e aos novos amigos. A todos, obrigada pelas lições e momentos. Aos mestres desde à primeira infância, passando pelos da faculdade, até os da pós graduação. Meus espelhos e verdadeiros ídolos. Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, obrigada pela paciência, pela confiança e pela ajuda em todos os momentos. A todos os funcionários da Uninove, pela disposição e prontidão em auxiliar. Especialmente aos técnicos Giovani, Márcio e Giovana, às secretárias Ligia, Priscila e Juliana. Às minhas amigas durante o programa: Ana Carolina Araruna, Márcia Ataíze, Maíra Brandão, Aline Silva e Tatiane Stancker, que foram meus anjos da guarda. Com vocês, tudo foi mais leve. Aos demais colegas de mestrado na Uninove. À CAPES pela bolsa PROSUP (Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares). E a todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento.

## RESUMO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica recidivante caracterizada por uma inflamação crônica e sistêmica. O estresse oxidativo tem sido referido no envolvimento em várias condições de doenças, como artrite reumatóide (AR). Estudos experimentais *in vivo*, utilizando a terapia de fotobiomodulação têm demonstrado efeitos positivos na diminuição da peroxidação lipídica, e no aumento das atividades antioxidantes. A prática regular de exercício físico também vem sendo relatada como um tratamento benéfico capaz de diminuir os danos oxidativos. Sendo assim, esta pesquisa tem por objetivo analisar os efeitos da terapia de fotobiomodulação nas doses 2 joules e 4 joules associado ao exercício físico sobre marcadores de estresse oxidativo em modelo experimental de artrite reumatóide. Foram analisadas expressão proteica: superóxido dismutase (SOD); e Glutathione Peroxidase (GPX) e Catalase (CAT), sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). 24 ratos machos wistar divididos em 4 grupos foram submetidos a um modelo de AR (CIA), 1ª imunização realizada na base da cauda nos dias 0, 07, e após 28 dias foi administrada 3ª dose intra-articular em ambos joelhos dos animais. Após última indução a terapia de fotobiomodulação foi iniciada imediatamente, por via transcutânea em dois pontos: medial e lateral, as aplicações seguintes aconteceram em dias alternados, totalizando 15 aplicações. O exercício na esteira começou no dia subsequente a última indução e teve duração de 5 semanas. Como resultados obtivemos a diminuição da peroxidação lipídica e aumento das atividades antioxidantes da SOD, GPX e CAT com exercício físico associado a terapia de fotobiomodulação nas doses de 2 joules e 4 joules. Conclusão: O exercício físico associado a terapia de fotobiomodulação diminui peroxidação lipídica e aumenta atividades antioxidantes.

Palavras Chaves: Fotobiomodulação, Artrite reumatóide, Estresse oxidativo, Exercício Físico, Expressão proteica.

## **Abstract**

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by chronic and systemic inflammation, which leads to destruction of the cartilage and bone, and affects tissues in multiple joints. Oxidative stress has been implicated in involvement in various disease conditions, such as rheumatoid arthritis (RA). In vivo experimental studies using photobiomodulation therapy (FBM) have shown positive effects in reducing lipid peroxidation and increasing antioxidant activity. The regular practice of physical exercise has also been reported as a beneficial treatment capable of reducing oxidative damage. The aim of this research was to analyze the effect of photobiomodulation therapy at 2 joules and 4 joules doses associated with physical exercise on oxidative stress in an experimental model of rheumatoid arthritis in protein expression: superoxide dismutase (SOD); Glutathione Peroxidase (GPX) and Catalase (CAT) on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Twenty-four male Wistar rats divided into 4 groups were submitted to an AR model (CIA). First immunization were performed at the base of the tail on the days 0 and 07, and after 28 days the third dose was administered intra-articular in both knees of the animals. After the last induction, FBM therapy was started immediately, transcutaneously at two points: medial and lateral, with a total of 15 applications. Treadmill exercise started the day after the last induction and lasted 5 weeks. As results we obtained the decrease of the lipid peroxidation and the increase of antioxidant activities of SOD, GPX and CAT with physical exercise associated to FBM in doses of 2 joules and 4 joules. Conclusion: Physical exercise associated with FBM therapy decreases lipid peroxidation and increases antioxidant activity.

Keywords: Photobiomodulation, Rheumatoid arthritis, Oxidative stress, Physical exercise, Protein expression.



## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	12
1.1.ARTRITE REUMATÓIDE.....	16
1.2.ARTRITE REUMATÓIDE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
1.3.ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
1.4.TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO.....	20
1.5.TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3.MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO .....	28
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	28
3.3.FLUXOGRAMA.....	29
3.4.MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO.....	30
3.5.TRATAMENTO COM TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO .....	31
3.6.TREINO EM ESTEIRA.....	33
3.7.ANÁLISES .....	35

<b>3.8.ANALISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>38</b>
<b>7.RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## Tabela de Símbolos

<b>AR</b>	Artrite Reumatóide
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MMP</b>	Metaloproteínase
<b>FBM</b>	Fotobiomodulação
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>RL</b>	Radicais Livres
<b>ERN</b>	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>GPX</b>	Glutathiona Peroxidase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>TBARS</b>	Ácido Tiobarbitúrico
<b>MDA</b>	Malonaldeído
<b>J</b>	Joules
<b>W</b>	Watts

**Nm**

Nanômetros

**Cm<sup>2</sup>**

Centímetro ao quadrado

## Lista de Figuras

Figura 1: Aparelho photon II laser DMC.....	31
Tabela 1 Densimetria laser.....	32
Figura 2 Progresso treino em esteira.....	33
Figura 3 TBARS.....	39
Figura 4 SOD.....	40
Figura 5 GPX.....	41
Figura 6 CAT.....	42
Figura 7 Imagem da banda.....	43

## Introdução

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune incapacitante que é caracterizada por dor significativa, desordem de articulação progressiva e incapacidade funcional. A AR é uma doença com causa desconhecida e tem uma prevalência de 0,5-1% entre os adultos em todo o mundo.

Esta doença inflamatória continua a provocar mortalidade prematura significativa e morbidade (1). Os pacientes com AR apresentam destruição articular por hiperplasia do revestimento sinovial, infiltração de células mononucleares na camada basal, estimulação de sinoviócitos tipo fibroblasto e aumento de mediadores catabólicos, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) da interleucina (IL)  $-1\beta$ ,  $-\alpha$  e metaloproteinases de matriz (MMP) (2).

A etiologia e a patogênese desta doença permanecem sem solução. Pensa-se que as interações entre vários fatores, incluindo fatores genéticos e ambientais, levam a uma imunomodulação inadequada e resultam em um processo inflamatório culminando em dano das estruturas sinoviais. Independentemente do gatilho exato, as espécies reativas de oxigênio (ERO) têm sido implicadas a desempenhar um papel importante neste processo (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) contribuem de forma distinta para a sinovite destrutiva e proliferativa da artrite reumatóide (AR) e desempenham um papel proeminente em eventos de sinalização celular (4).

Estudos indicam que o estresse oxidativo induzido por radicais livres está envolvido em várias doenças tais como diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas (doença de Parkinson-PD, doença de Alzheimer-AD e esclerose múltipla-EM), doenças cardiovasculares (aterosclerose e hipertensão) (Asma), desenvolvimento de catarata e artrite reumatóide (5).

As ERO produzidos dentro nas articulações podem também contribuir significativamente para a patogênese da artrite, uma vez que estes oxidantes inorgânicos são capazes de degradar os componentes da matriz por ação direta ou por ativação indireta de colagenases latentes (6).

Um número crescente de estudos clínicos mostrou que o exercício é benéfico para os pacientes com AR. Uma vasta gama de tipos de exercícios, incluindo de fortalecimento e aeróbicos, são concluídos como seguros, sem quaisquer efeitos adversos sobre a AR (7).

O exercício regular é benéfico para a nossa saúde, no entanto, o exercício exaustivo pode resultar em efeitos prejudiciais para a saúde, como danos musculares, inflamação e estresse oxidativo. Ressalta-se que, a contração muscular repetitiva envolve a acumulação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (8).

As espécies reativas de oxigênio representam uma séria ameaça ao sistema de defesa antioxidante celular, como diminuição da reserva de vitaminas antioxidantes e glutathione, e aumento da susceptibilidade dos tecidos aos danos oxidativos. Entretanto, os antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos têm demonstrado grande adaptação ao exercício agudo e crônico (9).

A formação de ERO é inerente ao metabolismo aeróbio, tendendo a promover a peroxidação lipídica e lesões oxidativas celulares. Estudos, no entanto, demonstram que o aumento na síntese de ERO também é importante para a homeostase corporal e para o bom funcionamento do sistema antioxidante. (10).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas em estudos nos últimos anos em uma tentativa de aumentar a capacidade antioxidante, tais como suplementação de antioxidantes, restrições dietéticas e drogas e tratamentos (10). Dentre elas estudos demonstram que a terapia de fotobiomodulação é uma terapia capaz de atenuar o estresse oxidativo através do aumento de atividades antioxidantes. (11,12,13).

A terapia de fotobiomodulação diminui o estresse oxidativo, proporcionando reparação mais rápida do tecido muscular (11). O uso desta terapia antes do exercício atrasa a fadiga muscular (12) e diminui o estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (13). Desde meados da década de 1960, o uso da energia luminosa como terapia para processos inflamatórios e trofismo celular abriu um novo campo de pesquisa sobre a compreensão da interação entre energia eletromagnética e tecido biológico (14). Mais recentemente, a terapia de fotobiomodulação tem sido usada para mitigar e retardar a fadiga muscular (15) em ensaios clínicos (16, 17) e estudos experimentais (18,19). Pesquisas demonstram a

capacidade da terapia de fotobiomodulação para melhorar a função mitocondrial e combater ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), gerado durante o exercício físico (11). De acordo com estes estudos a terapia de Fotobiomodulação modula eventos oxidativos, reduzindo o estresse oxidativo em diferentes situações (12, 13, 20, 21).

Estudos têm mostrado que a terapia de fotobiomodulação reduz os níveis de creatina quinase imediatamente após o exercício. A terapia de fotobiomodulação também atua nos marcadores de estresse oxidativo, como os carbonilos de proteína, SOD e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), além de observar que o exercício físico regular mais terapia de fotobiomodulação poderia ser uma importante estratégia para reduzir a produção supra fisiológica de ROS, seus níveis aumentam a atividade enzimática antioxidante e reduzem a peroxidação lipídica (20).

Diante do exposto, este estudo tem como hipótese que a irradiação com fotobiomodulação associado com exercício aeróbio exercício poderia conter o aumento do estresse oxidativo; agindo como um efeito protetor sobre a articulação na artrite reumatóide, e reduzindo o processo de degeneração articular da cartilagem e a inflamação sinovial antioxidante.

A literatura tem demonstrado os efeitos positivos do exercício físico moderado praticado com regularidade na artrite reumatóide, em estudos experimentais e clínicos o treinamento físico tem demonstrado efeito modulador sobre parâmetros oxidativos. Atualmente vem crescendo o número de pesquisas sobre os efeitos da terapia de fotobiomodulação e sua capacidade de diminuir os danos causados do estresse oxidativo. Estes resultados são obtidos por meio dos lasers de baixa intensidade em diversas situações clínicas e experimentais, na atenuação de marcadores de atividade oxidante e antioxidante. Diversos estudos que utilizaram a terapia de fotobiomodulação demonstraram resultados positivos no aumento das atividades antioxidantes SOD, CAT e GPx, contudo, os parâmetros oxidativos ainda não estão totalmente elucidados. A dose ainda não está bem estabelecida, assim como o tempo de exposição e a intensidade a ser utilizada na terapia de fotobiomodulação. Sendo assim, este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos de cinco semanas de exercícios físicos realizados em esteira associado a terapia de



fotobiomodulação no comprimento de onda de 808nm e potência 50mw, nas doses de 2 e 4 joules sobre marcadores de peroxidação lipídica e da atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase em um modelo experimental de artrite reumatóide induzida por colágeno tipo II.

## 1. ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica recidivante caracterizada por uma inflamação crônica e sistêmica, que leva a destruição da cartilagem e osso, afeta a membrana sinovial, e tecidos em múltiplas articulações (22,23,24,25).

A prevalência da AR é de 0,5 a 1% da população mundial, e as mulheres são as mais afetadas. A AR pode ocorrer em qualquer idade, embora o aparecimento seja mais frequente entre os 40 e 50 anos de idade. A etiologia e patogênese da doença permanecem desconhecidas (23,3). De maneira geral a artrite reumatoide acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas como rigidez matinal, edema das articulações, fadiga e perda de peso. Quando envolve outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em cinco a dez anos (3). A progressão da AR, leva a incapacidade para realização das atividades de vida diária bem como a profissional, causando impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (3,26). A susceptibilidade genética, com vários fatores ambientais também desempenham um papel crítico na patogênese desta doença, ativando o sistema imune, gerando processos altamente complexos e coordenados, perpetuando assim uma resposta autoimune (26).

A membrana sinovial é o alvo da resposta imune na AR. O revestimento sinovial normal que envolve a cápsula articular de articulações diartrodiais é caracterizado por uma fina camada de células de linhagem fibroblástica, denominadas sinoviócitos e macrófagos. Com a AR, o revestimento sinovial expande-se dramaticamente em associação com o crescimento alterado de sinoviócitos para formar uma estrutura chamada "pannus". Neste cenário, o fibroblasto sinovial na AR se torna destrutivo e produz mediadores que degradam a cartilagem e articulações.

Os diferentes fenótipos celulares envolvidos nas articulações (osteoblastos, osteoclastos, condrócitos, macrófagos, células B, Células T) atuam de formas complexas distintas e inter-relacionadas na patogênese e progressão das lesões articulares na AR. Erosão óssea subcondral, esclerose e degradação da

cartilagem articular são características centrais das lesões articulares na AR e levam a redução do espaço articular (27, 7).

### 1.1. ARTRITE REUMATÓIDE E ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) também são consideradas como fatores de risco e aceleradores de doenças auto-imunes, visto que existe uma estreita relação entre o estresse oxidativo e essas doenças. (3,28)

Estudos demonstraram que as espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidos na fisiopatologia da AR, é uma das condições que induzem ao estresse oxidativo, a produção de ERO aumenta cinco vezes em pacientes com AR quando comparados à indivíduos saudáveis, sugerindo que o estresse oxidativo é uma característica patogênica na AR, a geração de altos níveis de radicais livres (RL) na articulação e os níveis deficitários dos sistemas antioxidantes também estão envolvidos na doença (23,28,29).

Os radicais livres agem como mensageiros secundários em resposta imunológica celular na AR, podendo degradar diretamente a cartilagem articular, atacando os proteoglicanos e inibindo a sua síntese (23, 3).

Os danos oxidativos de produtos de lipoperoxidação e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade resultantes da oxidação de proteínas, também têm sido demonstradas na AR, bem como danos ao DNA (30).

O estresse oxidativo crônico na membrana sinovial na AR tem sido explicado pela elevada pressão intra-articular em articulações, o que aumenta a produção de ERO na fosforilação oxidativa celular e induz ciclos repetitivos de hipoxia / reoxigenação. (3, 26).

Sob condições normais a produção de ERO é controlado por uma variedade de sistema de defesa antioxidante presente no corpo. A defesa não enzimática antioxidante, glutathiona reduzida (GSH), enquanto antioxidante enzimática inclui superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx) (22,23).

## 1.2. ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio (ERO), quando produzidas em pequenas quantidades são benéficas para as células. A geração de radicais livres quando é contínua e fisiológica cumpre funções biológicas importantes (31, 32).

Os radicais livres (RL) e as ERO são essenciais para a homeostase e funcionamento celular adequado dos organismos vivos. Os átomos, moléculas, e os íons derivados de oxigênio são espécies reativas de oxigênio com alta reatividade (34). Os RL são átomos ou moléculas que nos orbitais externos possuem um elétron desemparelhado, permitindo a transferência de elétrons com moléculas vizinhas (33). Normalmente as formações de radicais livres acontecem nas mitocôndrias, que são membranas celulares e no citoplasma. A mitocôndria é a principal geradora de radicais livres, por meio da cadeia transportadora de elétrons (34).

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 são estruturais e funcionais induzidas pelas ERO nos diferentes componentes orgânicos, assim como as suas conseqüentes repercussões na funcionalidade celular. Entre as diversas fontes de produção de ERO reconhecidas, podemos destacar a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial músculo esquelético; e auto-oxidação de catecolaminas (35, 36, 37, 38).

Os antioxidantes são os compostos exógenos ou endógenos na natureza, com a função de evitar a geração de oxidantes tóxicos ou interceptar os que são gerados, e inativa-los, bloqueando a propagação da reação em cadeia que os pró-oxidantes produzem (39).

Há, nos organismos vivos, substâncias que neutralizam as EROs, chamadas de antioxidantes, 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 glutatona peroxidase (GPx). Estas enzimas constituem-se a defesa primária

contra a geração de ERO durante o exercício e sua atividade é conhecida por aumentar em resposta ao exercício tanto nos estudos em animais quanto em humanos. As enzimas SOD, GPX e a CAT são as principais defesas antioxidantes. (40, 41,42, 43, 44).

O balanço entre as taxas de produção e de remoção das ERO 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 ERO 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, é 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) (41, 45, 43, 46, 47).

### 1.3. EXERCÍCIO FÍSICO NA ARTRITE REUMATÓIDE E ESTRESSE OXIDATIVO

O exercício físico é benéfico para os pacientes com AR. Diferentes tipos de exercícios, incluindo exercícios de fortalecimento e aeróbicos, são concluídos como sendo seguros, sem quaisquer efeitos adversos na AR (48). No entanto, o exercício físico exaustivo pode resultar em efeitos prejudiciais para a saúde, como estresse oxidativo. (49).

As espécies reativas de oxigênio representam uma séria ameaça ao sistema de defesa antioxidante celular, como diminuição da reserva de vitaminas antioxidantes e glutathiona, e aumento da susceptibilidade dos tecidos aos danos oxidativos. Entretanto, os antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos têm demonstrado grande adaptação ao exercício agudo e crônico (50).

A formação de ERO é inerente ao metabolismo aeróbio, tendendo a promover a peroxidação lipídica e lesões oxidativas celulares. Estudos, no entanto,

demonstram que o aumento na síntese de ERO também é importante para a homeostase corporal e para o bom funcionamento do sistema antioxidante (51).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas em estudos nos últimos anos em uma tentativa de aumentar a capacidade antioxidante, tais como suplementação de antioxidantes, restrições dietéticas e drogas, entre estes tratamentos (51) tem sido demonstrado que a terapia de fotobiomodulação é uma terapia capaz de atenuar a oxidação aumentando as substâncias antioxidantes. Diminui o estresse oxidativo proporcionando reparo mais rápido no tecido muscular (12). O uso dessa terapia antes do exercício atrasa a fadiga muscular (13), diminui estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (52).

#### 1.4. TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO

A teoria da emissão estimulada em 1917 por Albert Einstein deu início a investigação das propriedades terapêuticas do laser. Essa teoria se tornou realidade em 1960, quando Theodore Maiman construiu o primeiro emissor de laser de Rubi (53). Laser é um acrônimo Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation que quer dizer amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Os mecanismos de ação sobre os tecidos é atribuído à capacidade de energia da luz ser absorvida pelas células (54).

Vários estudos demonstraram que a terapia de fotobiomodulação tem efeitos bioestimulantes ao nível celular. O mecanismo de ação ocorre através da absorção de fótons pelos cromóforos moleculares específicos atuantes na cadeia respiratória mitocondrial, é um efeito da estimulação por comprimento de onda específico. O tratamento com terapia de fotobiomodulação baseia-se na capacidade da luz alterar o metabolismo celular, devido a absorção pela mitocôndria e citocromo C oxidase. Inicialmente os efeitos da interação entre o laser e o tecido biológico podem provocar a liberação de substâncias, como a histamina, serotonina, bradicinina. As reações enzimáticas normais podem ser modificadas, sendo aceleradas ou ainda retardando tais reações. A eficiência da bomba sódio-potássio melhora com o aumento da produção de ATP. Esses efeitos melhoram a diferença de potencial

elétrico entre o interior e o exterior da célula. A biomodulação de vários processos intracelulares por irradiação com o laser de baixa intensidade tem sido bem estabelecida como o aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP (55, 56, 57, 58).

A terapia de fotobiomodulação é capaz de modular vários processos biológicos em modelos animais e em humanos, estimulando a cicatrização de feridas e a síntese de colágeno, promovendo o processo de regeneração do músculo, após lesão, diminui a resposta inflamatória, aumenta a neoformação de vasos sanguíneos na ferida (57, 59).

A irradiação com energia a laser produz efeitos biológicos, bioquímicos, e fisiológicos e eventos proliferativos em várias enzimas, células, tecidos, órgãos e organismos. A radiação a laser tem uma capacidade dependente do comprimento de onda para alterar o comportamento celular (60). Possui propriedades reparadoras, é considerada uma terapia segura para várias doenças e lesões (61).

#### 1.5. TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

A terapia de fotobiomodulação traz várias vantagens no tratamento de muitas patologias, tem sido utilizada no tratamento de doenças como tendinopatias, lesões musculares, pode aliviar sinais clínicos e sintomas. Demonstrou ainda efeitos favoráveis na modulação do estresse oxidativo, aumentando a atividade SOD, CAT e GPx, e ainda diminuindo a ERO (62, 63).

A ativação do sistema de produção de superóxido é mais rápida com o uso de lasers de baixa intensidade (64). A literatura demonstra que a terapia de fotobiomodulação tem efeitos positivos. Possui atividade antioxidante e neuroprotetora, aumenta os níveis de enzimas antioxidantes, atuando também sobre os carbonilos proteicos, SOD e TBARS (60, 65, 66).

Um mecanismo proposto da terapia de fotobiomodulação envolve a absorção de fotóns pelos cromóforos intracelulares e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que em concentrações abaixo do nível citotóxico tem efeitos estimulantes positivos sobre a célula. Os mecanismos de defesa que combatem a

produção excessiva de ERO podem ser alterados pela terapia de fotobiomodulação, de acordo com a dose, tempo de exposição e a intensidade utilizada (30, 65,66, 67).

Vários autores propuseram que a terapia com fotobiomodulação é capaz de influenciar os parâmetros de estresse oxidativo, podendo alterar as atividades de enzimas antioxidantes e a produção de ERO. A literatura tem relatado um aumento de interesse na aplicação da terapia com fotobiomodulação usando diferentes fontes de luz em doenças relacionadas com o aumento do estresse oxidativo, mas os mecanismos envolvidos nestas respostas ainda não estão bem estabelecidos, especialmente em relação aos efeitos da terapia por fotobiomodulação na cadeia respiratória mitocondrial e em biomarcadores de estresse oxidativo. Acredita-se que um dos possíveis mecanismos de ação dos lasers de baixa intensidade, é um breve e modesto aumento na produção de ERO, tais como superóxido e peróxido de hidrogénio, que conduz à restauração do desequilíbrio redox como consequência do aumento na produção de enzimas antioxidantes (25, 30, 68).

Os fótons dos lasers de baixa intensidade penetram profundamente no corpo através da pele, músculos, tendões, ligamentos, nervos e até mesmo ossos, identificam e atingem áreas dolorosas e danificadas. No entanto, o efeito da terapia de fotobiomodulação na modulação terapêutica da AR não estão esclarecidas, sua eficácia para a AR ainda é controversa, e uma das razões pode ser a aplicação inadequada da energia do laser, alguns estudos revelaram nenhum efeito benéfico dessa terapia (68, 69).

Entretanto, é possível que, dependendo da dose, do tempo de exposição e da intensidade, a terapia por fotobiomodulação possa alterar os mecanismos de defesa contra a produção excessiva de ERO (30).

Estudos demonstraram que terapia por fotobiomodulação em diferentes situações tem a capacidade de reduzir o estresse oxidativo (70).

A literatura tem demonstrado os efeitos positivos da terapia com fotobiomodulação relatados em diversos tipos de tecido, no entanto os resultados na cartilagem articular ainda são controversos, nos últimos anos vem crescendo o número de relatos na literatura da utilização dos lasers de baixa intensidade no controle do estresse oxidativo em diversas situações clínicas e experimentais, com



bons resultados na atenuação de marcadores de atividade oxidante e antioxidante (70).

Conforme estudos realizados por Lubart et al., (62); Fillipini et al, (17). Huang et al, (65), Liu et al, (66) existem evidências na literatura revelando que a terapia com fotobiomodulação 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 terapia com fotobiomodulação.

Segundo Servetto et al. (19), em uma pesquisa que tinha como foco investigar o efeito fotobiomodulador da terapia com fotobiomodulação 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 Lcitrulina e Sod e uma diminuição de óxido nítrico (NO). A aplicação da terapia de fotobiomodulação diminuiu significativamente a L-citrulina e a atividade da SOD e aumentou a concentração de NO.

Foram observados os efeitos da terapia de fotobiomodulação aplicado em lesões de pele induzidas experimentalmente; o laser foi aplicado 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 terapia com fotobiomodulação foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica, os danos às proteínas e a atividade de SOD e CAT, potencializando a cicatrização da ferida, nas doses de 1 e 3 J/cm<sup>2</sup> do laser de He-Ne e na dose de 3 J/cm<sup>2</sup> do laser de AsGa (Silveira et al.) (67)

Segundo Basso et al, (68) a terapia de fotobiomodulação reduz a produção de espécies reativas de oxigênio que acontece durante a fase aguda de lesão epitelial e muscular. Isso acontece, por acelerar o processo inflamatório e diminuir a exposição celular a EROs.

Ribeiro et al, (53), em uma pesquisa com objetivo de investigar o efeito da terapia de fotobiomodulação sobre mediadores de estresse oxidativo utilizaram dois comprimentos de onda de 660nm e 780nm em um modelo de criolesão no músculo

tibial anterior (TA). Os ratos foram sacrificados nos dias 1, 3 e 7. Como resultados houve a diminuição peroxidação lipídica, aumento das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx. Os autores concluíram que o LBI em momentos diferentes modula positivamente a atividade das enzimas antioxidantes e reduz marcadores de estresse durante o processo de reparação muscular.

Macedo et al, (59), pesquisaram os mecanismos antioxidantes da terapia com fotobiomodulação em doenças pulmonares. Os animais inalaram formaldeído 90 minutos/dia, durante 3 dias consecutivos. Os animais foram tratados com laser infravermelho 1 e 5 h após exposição ao formaldeído, a aplicação foi realizada em 9 pontos do trato respiratório, sendo 3 pontos na traquéia, 3 pontos do lobo direito e 3 pontos do lobo esquerdo, 60 segundos por ponto. Os autores concluíram que a terapia com fotobiomodulação pode ser um tratamento promissor para doenças pulmonares.

Tatmatsu Rocha et al (63), realizaram estudo com objetivo de investigar a possibilidade de aumentar colágeno e reduzir o estresse oxidativo e nitrosante na pele de camundongos diabéticos tratados com terapia de fotobiomodulação. O diabetes foi induzido pela administração de estreptozotocina. As feridas foram criadas 120 dias após a indução de diabetes, os animais foram irradiados diariamente durante 5 dias consecutivos, foi utilizado laser com comprimento de onda de 904 nm, potência de 40 mw durante 60 segundos. Os autores concluíram que a terapia com fotobiomodulação pode indicar possível efeito protetor do laser de 904 nm poderia ter na microvasculatura, com baixos níveis de nitrito e maior proteção contra danos oxidativos nas membranas lipídicas, teve efeito positivo na quantidade melhor-organizada e aumentada de fibras de colágeno demonstrando que essa terapia poderia ser eficaz na prática clínica no tratamento de feridas mal curadas em diabéticos. O efeito antioxidante benéfico observado em animais diabéticos abre a possibilidade de utilizar a terapia com fotobiomodulação como um tratamento para feridas tais como úlceras de pé diabético e outras doenças resultantes de diabetes mellitus.

Em recente estudo de Guaraldo et al (20), concluíram que a terapia com fotobiomodulação associada ao treinamento aeróbio pode reduzir o estresse oxidativo, as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX foram aumentadas.

Assis et al (58), estudaram em um modelo experimental de criolesão no meio do músculo tibial anterior direito de ratos, os efeitos do laser na lesão, animais foram tratados com laser meio ativo AsGa, 808 nm com potência de 30 mW e 1.4J de energia total, a aplicação foi realizada por 4 dias consecutivos, os resultados mostraram que laser de 808 nm foi capaz de atenuar o estresse oxidativo.

Em estudos de Nonato et al (69), pesquisaram os efeitos do exercício físico sobre os marcadores de estresse oxidativo em cérebros de ratos que praticaram natação. Os resultados mostraram que 8 semanas de natação atenuaram os danos oxidativos e aumentaram atividade antioxidante enzimática no cérebro dos animais.

Durante o exercício, fatores como intensidade e duração, bem como, o nível de treinamento dos participantes determina 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 suplantam a capacidade do sistema antioxidante endógeno em decorrência, promover graves lesões musculares, com conseqüente processo inflamatório local e estresse oxidativo (Schneider et al, (70); Cruzat et al (10).

Quando um estímulo como o exercício físico provoca uma elevada geração de ERO 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 desequilíbrio for mais intenso e duradouro caracteriza-se um estresse oxidativo crônico (Drodge, (43); Urso e Clarkson, (39); Oliveira et al (71).

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 O<sub>2</sub> intramuscular aumenta em aproximadamente 100 vezes e que 2 a 5 % do O<sub>2</sub> utilizado pelas mitocôndrias são convertidos em EROS, é razoável supor que a produção mitocondrial de superóxido em tais condições se encontre igualmente aumentada (Mastaloudis et al, (72); Urso e Clarkson, (39); Silveira, (73); Oliveira et al, (71); Schneider e Oliveira (70); Vancini et al, (74); Cruzat et al (10).

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, (75); Sen e Packer, (76).

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, (77); Zoppi et al, (38); Granot e Kohen, (78).

O caminho da peroxidação lipídica 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 (Vitala et al, (79).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito individual do exercício físico moderado e da terapia com fotobiomodulação comparando as doses 2 joules e 4 joules associado ao exercício físico sobre o estresse oxidativo em modelo experimental de artrite reumatóide.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar os efeitos da terapia com fotobiomodulação e comparar as doses 2 de joules e 4 joules associado ao exercício físico na expressão proteica: superóxido dismutase (SOD; GPX (Glutathione Peroxidase) e CAT (catalase) em joelhos de ratos submetidos a modelo experimental de artrite reumatóide.
- II. Avaliar os efeitos da terapia com fotobiomodulação e comparar as doses de 2 joules e 4 joules associado ao exercício físico sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em joelhos de ratos submetidos a modelo experimental de artrite reumatóide.
- III. Avaliar quais os efeitos do exercício físico moderado em esteira sobre estresse oxidativo em joelhos de ratos submetidos a modelo experimental de artrite reumatóide.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

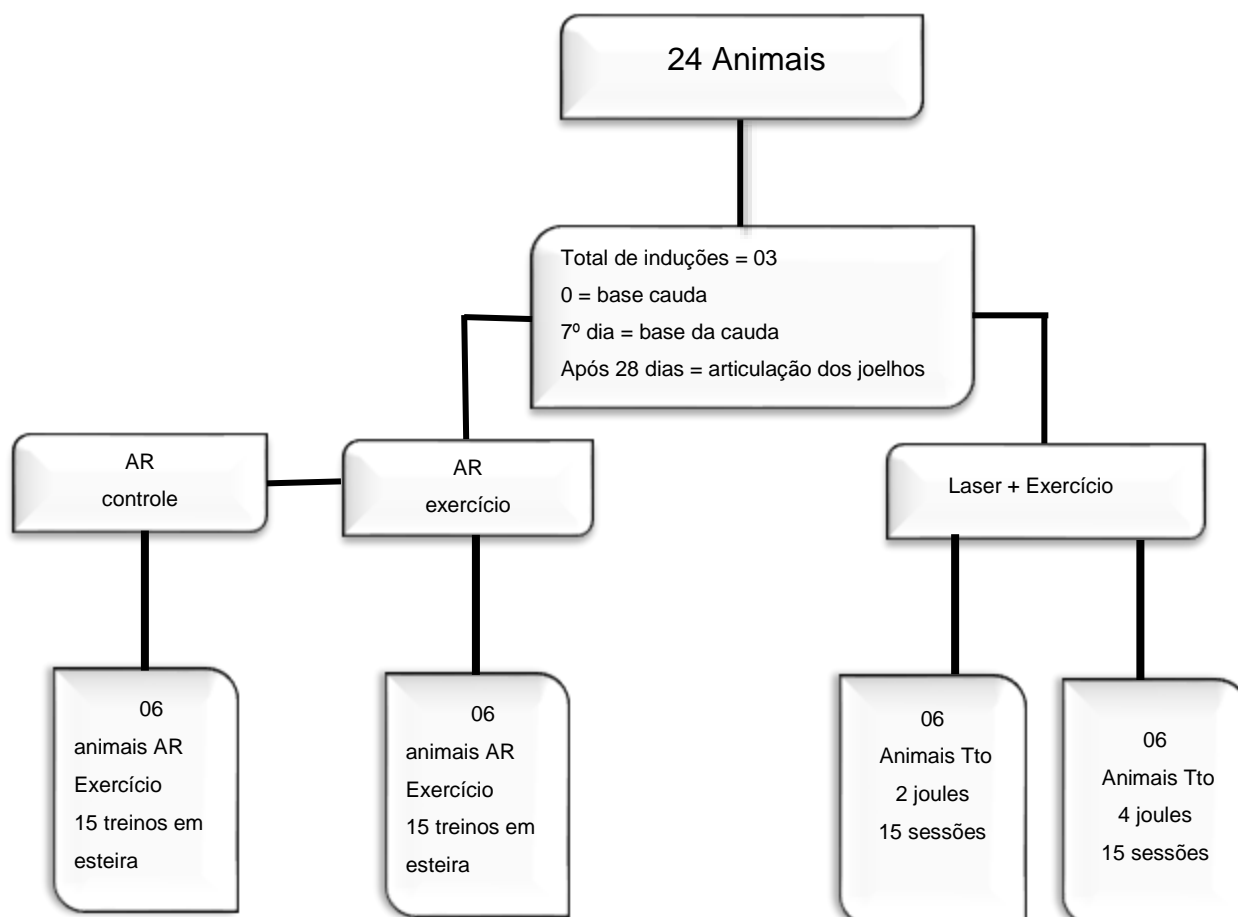
#### 3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 24 ratos, de linhagem Wistar, machos com idade 90 dias com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho - UNINOVE, mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, com água e alimentação ad libitum. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho-UNINOVE aprovou o protocolo de pesquisa (no. AN 0016-2015).

#### 3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Animais (n = 24) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, sendo 06 em animais em cada grupo, grupo controle AR, grupo AR+ exercício, grupo AR exercício + PBMT 2J, grupo AR exercício + PBMT 4J. O primeiro grupo (controle) foi induzido a AR, mas não recebeu qualquer tratamento; o segundo grupo foi induzido a AR e praticou exercício físico em esteira três vezes por semana em dias alternados por cinco semanas, o terceiro grupo foi induzido a AR praticou exercício em esteira três vezes por semana durante cinco semanas consecutivas e recebeu tratamento com terapia de fotobiomodulação com dose de 2 joules três vezes por semana em dias alternados durante cinco semanas consecutivas, o quarto grupo foi induzido a AR praticou exercício em esteira e recebeu tratamento de terapia de fotobiomodulação com dose de 4 joules em dias alternados três vezes por semana durante cinco semanas. A prática do exercício físico e o tratamento com terapia de fotobiomodulação aconteceram em dias distintos, sendo primeiro o tratamento com terapia de fotobiomodulação e no dia seguinte a corrida em esteira.

## 3.3. FLUXOGRAMA



### 3.4. MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO

O modelo CIA foi gerado de acordo com um estudo anterior (80). O colágeno tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em ácido acético a 0,05 M a 2 mg / ml, a substância permaneceu a uma temperatura de 4 ° C durante a noite, no dia seguinte a substância foi emulsionada em adjuvante completo de Freund CFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Vinte e quatro animais foram anestesiados antes de cada infiltração da substância indutora da lesão, com uma mistura de Quetamina (7%) e Xilasina (0,3%), em uma mistura de 2:1 utilizando-se 0,2 ml/100gr por via intraperitoneal. Depois de anestesiados os 24 animais foram posicionados em decúbito ventral, cada animal foi imunizado por injeção intradérmica de 100 µl de colágeno tipo II na base da cauda, a primeira indução foi realizada no dia 0. No sétimo dia os animais receberam uma segunda dose de 100 µl da substância indutora da lesão, novamente na base da cauda. Vinte e oito dias após a segunda indução, os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito dorsal, foi realizada a indução na articulação de ambos joelhos de cada animal, em cada joelho foi administrada injeção de 100 µl de colágeno tipo II.





### 3.5. TRATAMENTO COM TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO

O tratamento dos animais dos grupos exercício+PBMT 2J e exercício+PBMT 4J foram iniciados imediatamente após a última indução com colágeno tipo II. Os animais foram imobilizados por contenção e irradiados a um ângulo de 90° (81) em relação a superfície do tecido com laser por via transcutânea em dois pontos: medial e lateral, ambos joelhos receberam tratamento. Os animais do grupo AR (Exercício + PBMT 2J) recebeu irradiação em dias alternados de 40 segundos em cada ponto (total de 80 segundos em cada joelho). Enquanto os animais do grupo AR (Exercício + PBMT 4J) foram irradiados em dias alternados por 80 segundos em cada ponto (total de 160 segundos em cada joelho). O tratamento com terapia de fotobiomodulação foi realizado durante 5 semanas, com frequência de 3 vezes por semana totalizando 15 sessões.

Foi utilizado o laser diodo arseneto de alumínio e gálio Photon Laser III DMC (São Carlos, SP, Brasil).

A dosimetria e parâmetros estão resumidos na Tabela 1.



Figura 1 Photon Laser III DMC

**Tabela 1.** Parâmetros utilizados para a terapia de fotobiomodulação

<b>Grupos</b>	<b>PBMT - 2 J</b>	<b>PBMT - 4 J</b>
<b>Comprimento de onda ( nm)</b>	808	808
<b>Meio Ativo</b>	AsGaAl	AsGaAl
<b>Potência Média (mW)</b>	50	50
<b>Feixe de área (cm<sup>2</sup>)</b>	0.028	0.028
<b>Densidade de Potência (W/cm<sup>2</sup>)</b>	1.78	1.78
<b>Energia em joules</b>	2	4
<b>Densidade de energia (J/cm<sup>2</sup>)</b>	71.4	142.8
<b>Tempo por ponto</b>	40s	80s
<b>Quantidade de pontos</b>	2	2
<b>Total de Energia</b>	4 joules	8 joules

### 3.6. Treinamento na Esteira

O treino em esteira teve início no dia subsequente a última indução para os grupos G2 AR + Exercício, G3 AR Exercício + PBMT 2J e G4 AR Exercício + PBMT 4J. Os animais desses três grupos correram durante cinco semanas, em esteira com inclinação de 5%, na primeira semana os animais correram durante 5 minutos, a partir da segunda semana houve aumento gradativo do tempo, os animais correram durante 10 minutos, terceira semana 15 minutos, quarta semana 20 minutos e quinta semana 25 minutos (82).

Figura 2



**ESTEIRA INBRAMED SUPER ATL (Porto Alegre – RS – Brasil)**

## 6.7 EUTANÁSIA

Os animais de cada grupo foram pesados, para administração de tiopental (THIOPENTAX - Cristália) dose de 100mg/kg (DL) e lidocaína 10mg/ml (Xylestesin - Cristália), a dose foi administrada por via intraperitoneal, o procedimento de eutanásia foi imediatamente após o último dia de exercício. Após a eutanásia foi realizada a tricotomia de ambos joelhos com lâmina de barbear. Os animais foram, então, posicionados em decúbito dorsal, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução. Foi desarticulada a articulação femoro-tibial de ambas patas traseira de cada animal, para análise do tecido cartilaginoso, também foi realizado procedimento para obtenção do lavado articular.

O material coletado foi imediatamente centrifugado a  $-4^{\circ}$  a 5000rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e armazenado  $-80^{\circ}$ .

## 6.8.ANÁLISES

### 6.8.1 ANÁLISE EXPRESSÃO PROTEÍCA DE SUPERÓXIDO DISMUTASE, CATALASE E GLUTATIONA PEROXIDASE POR WESTERN BLOTTING

O tecido articular foi homogeneizado a 4 ° C em tampão de RIPA (BioRad®, Bio Rad Laboratories, EUA) e inibidor de protease (Sigma, St. Louis, MOM, EUA), foi centrifugada a 14000 rpm por 20 minutos em temperatura -4 ° C. O sobrenadante foi então recolhido. Para quantificação da amostra foi realizado ensaio colorimétrico de Bradford, para determinação total de proteína. O reagente de Bradford foi diluído em uma proporção 1:4 em água deionizada. A curva foi preparada com BSA.

Foi colocado 10µ da curva (branco, amostra) na placa e adicionado 190µ da solução de Bradford diluída. Em seguida a leitura foi realizada em espectrofotometro (Sunnyvale, CA, EUA) com comprimento de onda de 595 nM.

#### Preparação dos Géis de Acrilamida

Para cada gel (SDS –PAGE) de 15 poços foi utilizado 4 ml Solução A (Resolver, Bio-Rad), 4 ml solução B (Resolver, Bio-Rad), 40µ de APS 10% (Persulfato de amônio, Bio-Rad), 4µ de Temed (Bio-Rad). A solução foi adicionada em aparato de vidro.

Em seguida foi adicionada 1 ml da solução A (Stacker, Bio-Rad), 1 ml da solução B (Stacker, Bio-Rad), 10µ de APS 10% (Persulfato de amônio, Bio-Rad), 2µ de Temed (Bio-Rad).

#### Corrida

Após 30 minutos o gel foi colocado em Câmara de eletroforese (Bio-Rad) adicionado tampão de corrida (água deionizada e Tris Bio-Rad).

As alíquotas de proteína foram de 30µ, as amostras adicionadas em tampão de amostra (Laemmli - Bio-Rad) e β-mercaptoetanol, em seguida foram

aquecidas uma temperatura de 95 ° C durante 5 minutos. As amostras foram pipetadas nos poços. O aparelho foi programado a 200 V, a corrida durou de 35 a 40 minutos.

#### Transferência para Membrana

A transferência foi realizada Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad), o sistema permitiu a transferência de proteína em 10 minutos, uma combinação papel filtro membrana e papel de filtro formando “sanduíche” que proporcionou a transferência.

#### Incubação

As membranas de cada proteína foram bloqueadas por 60 minutos, em BSA (Sigma, St. Louis, MOM, USA) diluído em TBST em seguidas foram incubada em seus respectivos anticorpos primários.

A superóxido dismutase (SOD) foi incubada no anticorpo da abcam ab13498 (Cambridge, Reino Unido), diluído em TBS, BSA e Tween 20 (Sigma, St. Louis, MOM, USA), por 24 horas. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos (cada vez) em TBST, em seguida foram incubadas no anticorpo secundário anti-rabbit, por duas horas, após o secundário foram lavadas novamente em TBST 3 vezes durante 10 minutos cada lavagem.

A glutational peróxidase (GPx) foi incubada no anticorpo da abcam ab108427 (Cambridge, Reino Unido), diluído em TBS, BSA e tween 20 (Sigma, St. Louis, MOM, USA), por 24 horas. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos (cada vez) em TBST, em seguida foram incubadas no anticorpo secundário anti-rabbit, por duas horas, após o secundário foram lavadas novamente em TBST 3 vezes durante 10 minutos cada lavagem.

A catalase (CAT) foi incubada no anticorpo da abcam ab16731 (Cambridge, Reino Unido), diluído em TBS, BSA e tween 20 (Sigma, St. Louis, MOM, USA), por 24 horas. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos (cada vez) em TBST, em seguida foram incubadas no anticorpo secundário anti-rabbit, por duas horas, após o secundário foram lavadas novamente em TBST 3 vezes durante 10 minutos cada lavagem.

Após a última lavagem cada membrana separadamente, foi banhada em reagente de detecção Amersham ECL Prime (GE Healthcare Life Sciences), e imediatamente colocada no equipamento Amersham Imager 600 (GE Healthcare), aparelho sensor de quimioluminescência sensível para imagens digitais de alta resolução de amostras de proteínas e DNA em géis e membranas.

### 6.8.2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (MDA)

O ensaio foi realizado usando um kit comercial (Peroxidação Lipídica (MDA) estojo de ensaio colorimétrico / fluorométrico AB 118970 Abcam plc, (Cambridge, Reino Unido) seguindo as instruções do fabricante. Este ensaio baseia-se na reação de duas moléculas do reagente cromogénico N-metil-2-fenilindole com uma molécula de malondialdeído (MDA) a 45 ° C, para produzir um cromóforo estável. Os níveis de MDA foram monitorados pela leitura da absorvância a 586 nm, onde a absorvância é proporcional à concentração.

#### Preparação das amostras

Foram homogeneizados 10 mg de tecido em 300 µl de tampão de lise MDA (com 3 µl de BHT (100X), depois centrifugados (13.000 x, 10 minutos) para remover o material insolúvel. Foram colocados 200 µl do sobrenadante de cada amostra homogeneizada em eppendorfs.

#### Preparação da curva padrão

Foi diluído 10 µl do padrão MDA com 407 µl de ddH<sub>2</sub>O para preparar uma solução de MDA 0,1 M, depois foi diluído 20 µl da solução de MDA 0,1 M com 980 µl de ddH<sub>2</sub>O para preparar um Padrão MDA 2 mM.

#### Ensaio colorimétrico

Adicionado 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl do Padrão MDA 2 mM em tubos de microcentrífuga separados e ajustar o volume final para 200 µl com ddH<sub>2</sub>O para

gerar 0, 4, 8, 12, 16 e 20 nmol padrão por poço.

Em seguida adicionado 600 µl de solução de TBA em cada frasco contendo padrão e amostra. Foi aquecida a uma temperatura de 95 ° C durante 60 min. Arrefecida até à temperatura ambiente num banho de gelo durante 10 min. Pipetado 200 µl (de cada 800 µl de mistura reacional) para uma microplaca de 96 poços para análise.

Para mais sensibilidade, foi adicionado 300 µl de n-butanol para extrair o aduto MDA-TBA da mistura reacional de 800 µl. As camadas foram separadas por centrifugação (3 min a 16 000 x g). Evapora-se o n-butanol e dissolve-se o aduto MDA-TBA em 200 µl de ddH<sub>2</sub>O e depois foi colocado na microplaca de 96 poços para análise.

Para o ensaio colorimétrico a leitura foi a absorvância a 532 nm.

Análise de dados

A curva Padrão MDA foi traçada e, em seguida, calculada a quantidade de MDA na amostra de teste.

Foi determinada a quantidade de amostra equivalentes de MDA em nmol por interpolação a partir da curva padrão. Foram corrigidos os valores das amostras para quaisquer outras diluições realizadas durante a preparação da amostra.

## 6.9 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados encontrados foram distribuídos normalmente (teste de Shapiro-Wilk), e uma ANOVA de uma via com o teste post hoc de Tukey foi utilizado para comparações entre cada grupo. Todos os dados foram expressos como a média ± desvio padrão (SD). Utilizou-se o programa de software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), e considerado P <0,05 para indicar uma diferença significativa do poder de amostra usando o G \* software Power e encontrou 80% de potência para todos os resultados analisados.



## 1. Resultados

### Concentração do Ácido Tiobarbitúrico (Tbars)

A média de concentração de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (densidade optica DO), foram as seguintes: Grupo Controle AR ( $0.29 \pm 0.09$ ), Grupo AR Exerc ( $0.17 \pm 0.07$ ), Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $0.06 \pm 0.018$ ) Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $0.13 \pm 0.04$ ). Na comparação estatística utilizando *post hoc test* Tukey com o Grupo Controle AR obteve-se diferença estatística com os seguintes grupos: AR Exerc ( $p < 0.05$ ), Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $p < 0.001$ ) e Grupo AR Exerc PBMT 4 J ( $p < 0.01$ ). Na comparação com o grupo RA Exerc foi constatado diferença apenas com o Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $p < 0.05$ ). Quando comparamos os dois grupos tratados com fotobiomodulação não foi verificada diferença estatística entre estes ( $p \geq 0.05$ ). Tais achados nos permitem afirmar que a fotobiomodulação associada ao exercício aeróbico principalmente com 2 J de energia foi capaz de diminuir a concentração deste marcador de estresse oxidativo. (Figura 3.)

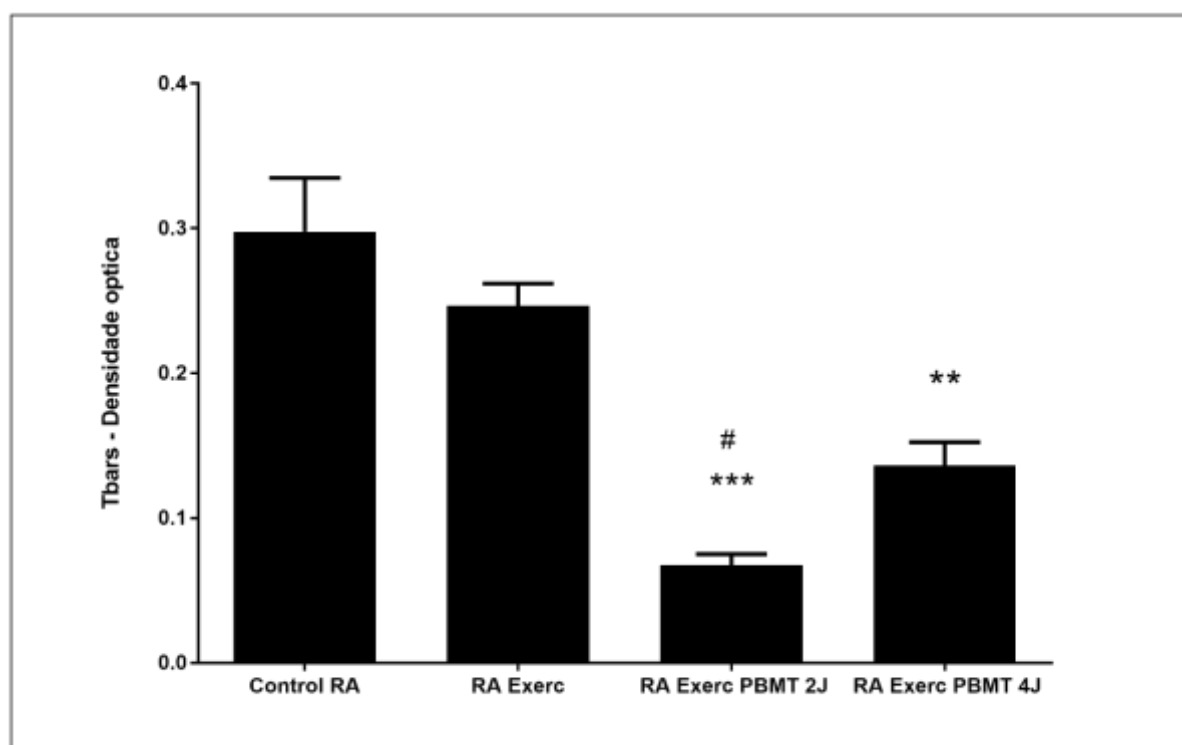


Figura 3. Comparação das médias e desvio padrão da concentração do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), entre os grupos: Controle Artrite Reumatoide (Controle AR), Artrite Reumatoide associada a exercício aeróbico (AR Exerc.), Artrite reumatoide tratado com fotobiomodulação com energia de 2 Joule associado ao exercício (AR

Exerc PBMT 2 J) e grupo Artrite reumatoide tratado com fotobiomodulação com energia de 4 Joule associado ao exercício (AR Exerc. PBMT 4 J). \* ( $p < 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ) e \*\*\* ( $p < 0.001$ ), comparadas ao grupo Controle. AR # ( $p < 0.05$ ) comparadas ao grupo AR Exerc.

### Expressão proteica Superóxido Dismutase – SOD

A média da expressão proteica da Superóxido Dismutase (SOD)(expressão relativa - unidade arbitrária ), foram as seguintes: Grupo Controle AR ( $122.0 \pm 5.88$ ), Grupo AR Exerc ( $158.3 \pm 21.45$ ), Grupo AR Exerc. PBMT 2 J ( $191.8 \pm 11.84$ ) Grupo AR Exerc PBMT 4 J ( $152.3 \pm 23.17$ ). Na comparação estatística utilizando *post hoc test* Tukey com o Grupo Controle AR obteve-se diferença estatística com os seguintes grupos: AR Exerc. ( $p < 0.05$ ), Grupo AR Exerc. PBMT 2 J ( $p < 0.001$ ). Quando comparamos os dois grupos tratados com fotobiomodulação (AR Exerc PBMT 2 J e grupo AR Exerc PBMT 4 J) foi verificada diferença estatística ( $p < 0.05$ ). Na comparação entre os demais grupos não houve diferença estatística ( $p \geq 0.05$ ). (Figura 6. e Figura 7.)

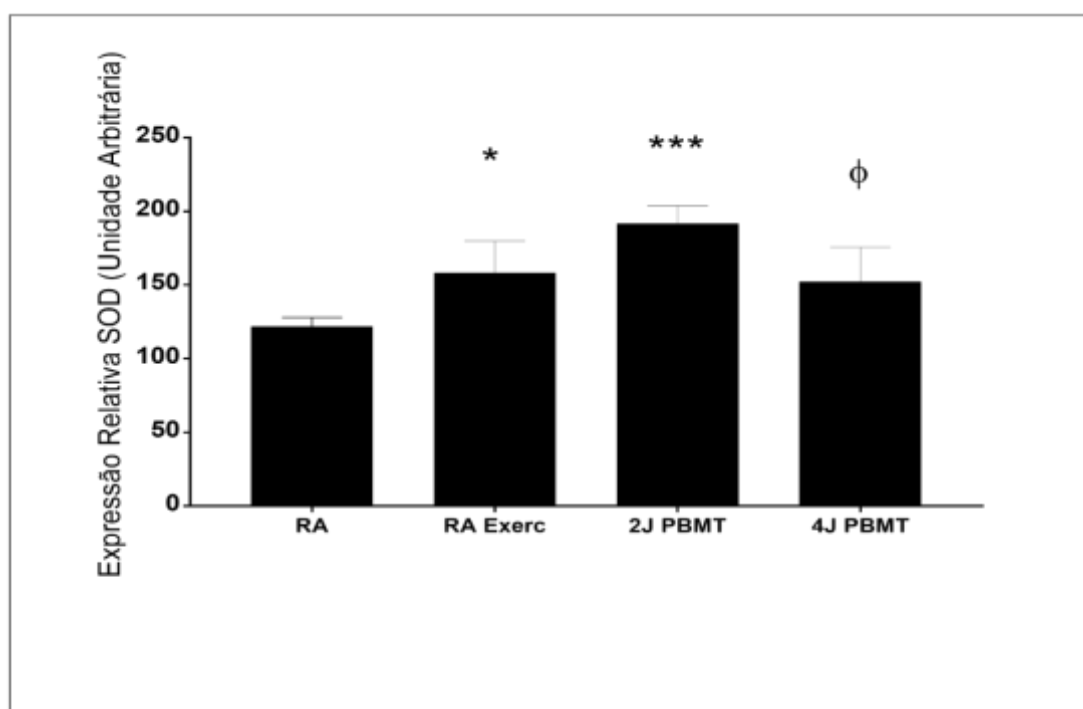


Figura 4. Comparação das médias e desvio padrão da expressão proteica da Superóxido Dismutase- SOD, entre os grupos: Controle Artrite Reumatoide (Controle AR), Artrite Reumatoide associada a exercício aeróbico (AR Exerc), Artrite

reumatoide tratado com fotobiomodulação com energia de 2 Joule associado ao exercício (AR Exerc PBMT 2 J) e grupo Artrite reumatoide tratado com fotobiomodulação com energia de 4 Joule associado ao exercício (AR Exerc PBMT 4 J). \* ( $p < 0.05$ ) e \*\*\* ( $p < 0.001$ ), comparadas ao grupo Controle. AR.  $\phi$  ( $p < 0.05$ ) comparadas ao grupo AR Exerc PBMT 2J.

### Expressão proteica Glutationa peroxidase- GPX

A média da expressão proteica da glutathiona peroxidase (GPX) (expressão relativa - unidade arbitrária), foram as seguintes: Grupo Controle AR ( $60.75 \pm 14.06$ ), Grupo AR Exerc ( $76.2 \pm 17.66$ ), Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $109.3 \pm 8.30$ ) Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $135.5 \pm 18.73$ ). Na comparação estatística utilizando *post hoc test* Tukey com o Grupo Controle AR obteve-se diferença estatística com os seguintes grupos: Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $p < 0.01$ ) e Grupo AR Exerc PBMT 4 J ( $p < 0.001$ ). Já na comparação estatística utilizando *post hoc test* Tukey com o grupo AR Exerc foi constatado diferença com os Grupos AR Exerc PBMT 2 J ( $p < 0.05$ ) e AR Exerc PBMT 4 J ( $p < 0.001$ ). Quando comparamos os dois grupos tratados com fotobiomodulação não foi verificada diferença estatística entre estes ( $p \geq 0.05$ ). (Figura 5. e Figura 7).

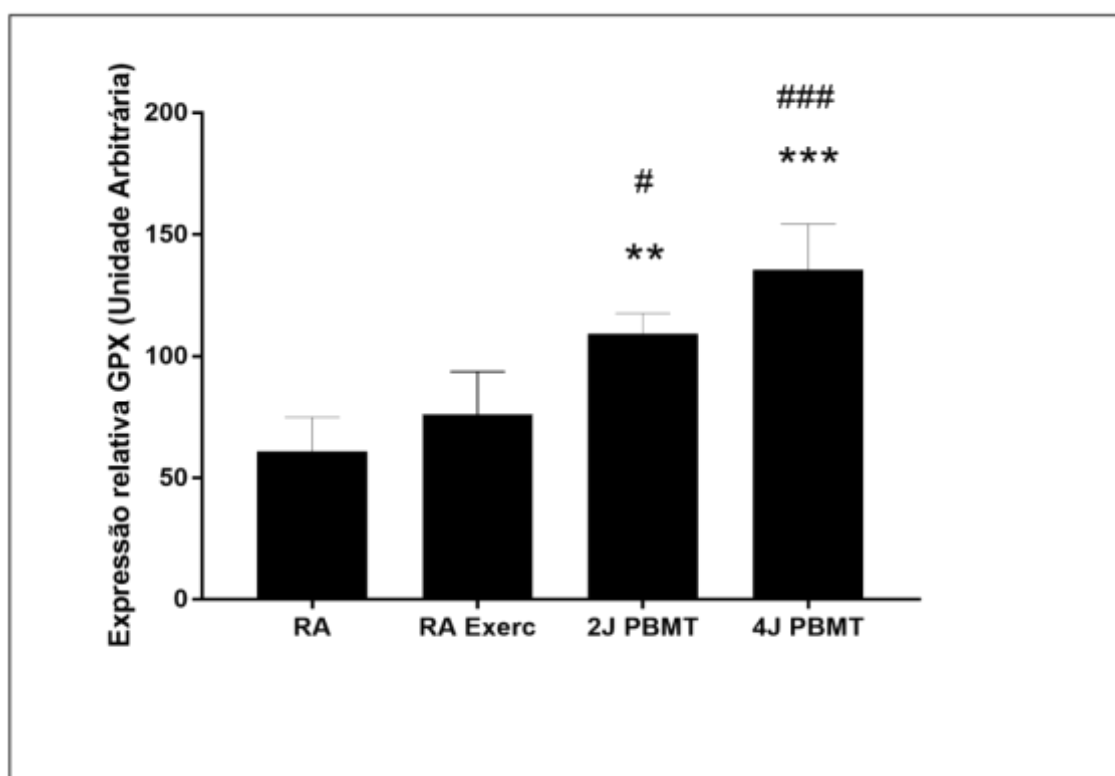


Figura 5. Comparação das médias e desvio padrão da expressão proteica da Glutathiona peroxidase- GPX , entre os grupos: Controle Artrite Reumatoide (Controle AR), Artrite Reumatoide associada a exercício aeróbico (AR Exerc), Artrite reumatoide tratado com fotobiomobulação com energia de 2 Joule associado ao exercício (AR Exerc PBMT 2 J) e grupo Artrite reumatoide tratado com fotobiomobulação com energia de 4 Joule associado ao exercício (AR Exerc PBMT 4 J). \*\* ( $p < 0.01$ ) e \*\*\* ( $p < 0.001$ ), comparadas ao grupo Controle. AR # ( $p < 0.05$ ); ### ( $p < 0.001$ ), comparadas ao grupo AR Exerc.

### Expressão proteica Catalase - CAT

A média da expressão proteica da catalese (CAT) (expressão relativa - unidade arbitrária ), foram as seguintes: Grupo Controle AR ( $115.4 \pm 7.79$ ), Grupo AR Exerc ( $183.2 \pm 16.63$ ), Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $169.7 \pm 9.36$ ) Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $202.6 \pm 36.84$ ). Na comparação estatística utilizando *post hoc test* Tukey com o Grupo Controle AR obteve-se diferença estatística com os seguintes grupos: AR Exerc ( $p < 0.001$ ), Grupo AR Exerc PBMT 2 J ( $p < 0.01$ ) e Grupo AR Exerc PBMT 4 J ( $p < 0.001$ ). Na comparação entre os demais grupos não houve diferença estatística ( $p \geq 0.05$ ). (Figura 4. e Figura 7).

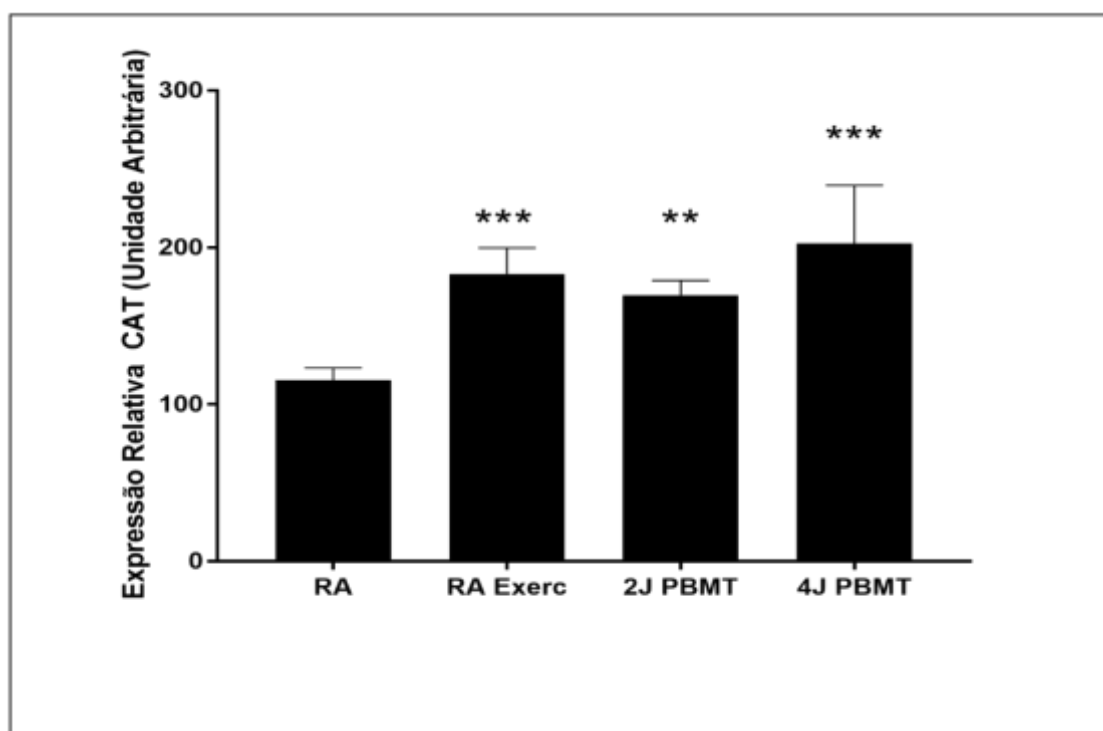


Figura 6. Comparação das médias e desvio padrão da expressão proteica da Catalase - CAT, entre os grupos: Controle Artrite Reumatoide (Controle AR), Artrite

Reumatoide associada a exercício aeróbico (AR Exerc), Artrite reumatoide tratado com fotobiomobulação com energia de 2 Joule associado ao exercício (AR Exerc PBMT 2 J) e grupo Artrite reumatoide tratado com fotobiomobulação com energia de 4 Joule associado ao exercício (AR Exerc FBM 4 J). \*\* ( $p < 0.01$ ) e \*\*\* ( $p < 0.001$ ) comparadas ao grupo Controle AR.

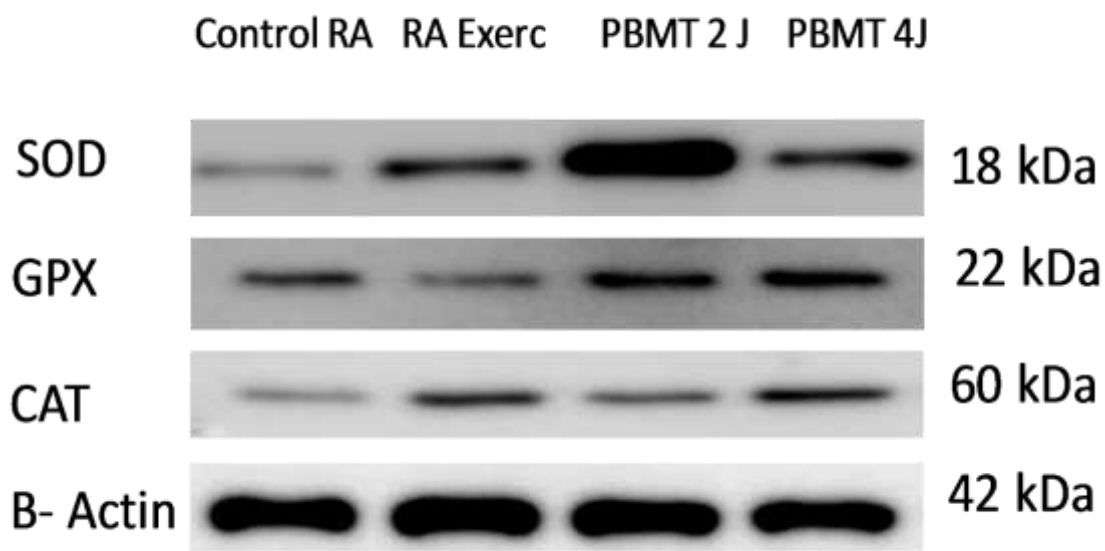


Figura 7. Indicação do Western blot analise do SOD banda (18 kDa); GPX banda (22 kDa); CAT banda (60 kDa) e the  $\beta$ -actina banda (42 kDa).

## DISCUSSÃO

O presente estudo teve como eixo principal investigar a ação da terapia por fotobiomodulação associada ao exercício em um modelo experimental de artrite reumatoide em ratos. Partimos da premissa que independente de como inicia-se o processo de instalação da artrite reumatoide o acúmulo de espécies reativas de oxigênio tem um papel importante contribuindo com a sinovite destrutiva e proliferativa da artrite reumatoide, principalmente, nos eventos de sinalização celular. Dada a importância deste evento na artrite reumatoide, propostas de tratamentos que diminuem o estresse oxidativo e melhora as defesas antioxidantes passam a ter fundamental importância no controle da doença.

Neste contexto, o exercício físico tem sido motivo de controvérsias tendo em vista que diversos autores afirmam que o exercício agudo de alta intensidade aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, incluindo a atividade de peroxidação lipídica. Entretanto, diversos outros autores têm demonstrado que o exercício físico realizado de forma moderada e contínua (treinamento) pode melhorar a capacidade antioxidante atenuando assim o estresse oxidativo.

A terapia por fotobiomodulação no estresse oxidativo também tem sido estudada por diversos pesquisadores que tem demonstrado que ela é capaz de atenuar a peroxidação lipídica e aumentar as defesas antioxidantes por meio do aumento da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx). Diante do exposto em nosso estudo temos como hipótese principal se a associação destas duas formas de abordagem terapêuticas poderia potencializar suas ações tanto na diminuição dos níveis de ácido tiobarbitúrico (TBARS) um importante marcador de peroxidação lipídica e da atividade de antioxidantes tais como SOD, CAT e GPx.

Assevera-se que o presente estudo teve como objetivo investigar o comportamento da atividade oxidante e antioxidante na cartilagem articular e no líquido sinovial, em um modelo de artrite induzida pelo colágeno II, submetido à ação da terapia de fotobiomodulação associado ao treinamento aeróbico.

Neste estudo utilizamos um modelo experimental de AR por colágeno associado ao adjuvante completo de Freund, empregado por diversos outros

estudos tendo em vista que tal modelo é capaz de mimetizar vários aspectos clínicos e histológicos desta doença articular (83,81), dividimos aleatoriamente os animais em 4 grupos, sendo: grupo AR controle, AR exercício, AR exercício+PBMT 2 J, e AR exercício+PBMT 4 joules.

De acordo com Myers et al. (80), a artrite induzida por colágeno (CIA) é um modelo autoimune que em muitos aspectos se assemelha a artrite reumatóide (AR). A imunização de estirpes geneticamente susceptíveis de roedores e primatas com colágeno tipo II (CII) leva ao desenvolvimento de uma artrite poliarticular grave que é mediada por uma resposta autoimune. Tal como a AR, a sinovite e as erosões da cartilagem e do osso são características da CIA, embora não seja idêntica à AR, a CIA estabelece claramente a plausibilidade biológica de que uma reação autoimune a um componente da cartilagem pode levar a uma poliartrite crônica, destrutiva.

Para Rosloniec et al. (84) A artrite induzida por colágeno modelo de roedores (CIA) é um modelo autoimune amplamente estudado de artrite reumatóide. Neste modelo, a artrite autoimune é induzida por imunização com colágeno de tipo II (CII) emulsionado em adjuvante completo de Freund. Neste modelo, os primeiros sinais de artrite aparecem aproximadamente 21 a 28 dias após a imunização.

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada por inflamação crônica que afeta principalmente as articulações e o metabolismo oxidativo desregulado, é um mecanismo significativo que desempenha um papel importante na fisiopatologia da doença (85). Phillipin et. al (7) afirmam que as ERO produzidas em excesso dentro das articulações também podem contribuir significativamente para a patogênese da artrite, (67) causando danos as biomoléculas e dificultando a recuperação de tecidos que sofreram lesões, uma vez que estes oxidantes inorgânicos são capazes de degradar os componentes da matriz por ação direta ou por ativação indireta de collagenases latentes (86).

As enzimas antioxidantes são importantes e desempenham papel complementar e fundamental para inibir danos oxidativos e manter o estado redox. 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 glutathiona peroxidase produzidos como subprodutos da ação lesiva de ERO sobre lipídios. Vale ressaltar que o desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e

antioxidantes, é o fator gerador do estresse oxidativo, que pode ser por aumento de ERO ou diminuição das atividades antioxidantes.

Nossos achados no grupo AR controle evidenciam esse desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes e demonstram níveis significativamente elevados de peroxidação lipídica no grupo artrite reumatoide sem nenhum tipo de intervenção e diminuição das atividades antioxidantes. Estes resultados vão de encontro aos aos diversos estudos experimentais (3, 22, 23, 26, 30 ).

A fim de verificar se treinamento físico exerce algum tipo de alteração na peroxidação lipídica e nas enzimas antioxidantes nossos animais que foram submetidos ao modelo de CIA (artrite reumatoide experimental) realizaram um treinamento moderado de cinco semanas em esteiras onde o tempo foi aumentando gradativamente, 5 minutos a cada semana, os animais iniciaram o treino na primeira semana com 5 minutos de corrida e 10 metros percorridos, na última semana de treino os animais correram 25 minutos e percorreram 20 metros. Analisamos a peroxidação lipídica por meio de quimiluminescência e a atividade antioxidante por meio da expressão proteica por western blotting, sendo que nossos resultados apontaram uma diminuição da peroxidação lipídica (Tbars). Estes achados foram semelhantes aos encontrados por outros autores (69, 87).

Na análise das atividades antioxidantes por meio da expressão proteica da SOD, GPx CAT encontramos, aumento significativo das enzimas SOD e CAT, quando comparadas ao grupo AR sem tratamento. Os resultados encontrados em nosso estudo sugerem que a prática de exercício na AR é segura e proporciona diminuição da atividade oxidante e aumento das defesas antioxidantes.

O exercício de treinamento a longo prazo estimula a resposta adaptativa aumentando o sistema de defesa antioxidantes combatendo o excesso de espécies reativas de oxigênio (9). Além disso melhora a resistência tecidual ao estresse oxidativo (88). Quando praticado regularmente o exercício reduz a formação de ERO, podendo aumentar as atividades antioxidantes por pelo menos 24 horas (8, 89).

Por outro lado, o exercício físico agudo de alta intensidade de acordo com Parker et. al (90) pode alterar o estado redox, causando um aumento da produção de ERO, este aumento pode estar relacionado com uma maior atividade da fibra muscular afetando as mitocôndrias, retículo sarcoplasmático, túbulos transversos,



sarcolema e nocitosol (91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 42). 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 por meio das alterações hormonais, metabólicas e circulatórias promovidas pelo exercício e pelo aumento da concentração de lactato (98, 95, 99).

No presente estudo ainda propomos encontrar uma estratégia para equilibrar o estado redox, e diminuir os danos oxidativos, assim investigamos os efeitos do exercício físico associado com a terapia de fotobiomodulação, visto que na literatura existem vários relatos sobre os efeitos da terapia de fotobiomodulação no estresse oxidativo.

O mecanismo fotobiológico de ação via ativação da cadeia respiratória, onde os fotoreceptores realizam o controle sobre o nível de ATP intracelular. Estes eventos podem significar uma alteração no metabolismo das células. Ativação e mudanças na propriedade redox dos componentes da cadeia respiratória nas células: a fotoexcitação de certos cromóforos na molécula citocromo c oxidase influencia a condição redox destes centros e, conseqüentemente, a taxa de escoamento dos elétrons no interior da molécula.

Silveira et. al (67) sugere que a terapia de fotobiomodulação consegue estimular as atividades das enzimas antioxidantes por meio da modulação bioquímicas nas células. Para Fujimaki et. al (10) a terapia de fotobiomodulação diminui a ERO através da interferência na produção de neutrófilos que é um gerador de ERO, quando a luz reage com a hemoglobina aumenta a produção de oxigênio.

Em nosso estudo comparamos a ação da terapia de fotobiomodulação associada ao exercício, e verificamos que esta associação pode diminuir peroxidação lipídica, bem como o aumento da expressão protéica da SOD, GPX e CAT, nos grupos tratados com doses de energia de 2 e 4 joules quando comparados ao grupo sem tratamento. Resultados a respeito dos indicadores oxidativos semelhantes foram encontrados em outros estudos, que obtiveram o aumento das atividades da SOD e CAT (101, 102).

Quando realizamos a comparação entre o exercício físico e as duas doses propostas (2 e 4 joules) associadas ao exercício as duas doses apresentaram resultados positivos na modulação dos parâmetros oxidativos, no entanto quando

comparamos os resultados entre as duas doses, 2 joules mostrou resultados significativos em todas as análises realizadas tanto no marcador oxidativo quanto nas enzimas antioxidantes quando comparado ao grupo AR sem tratamento.

Vale ressaltar que o presente estudo tem limitações, uma vez que, embora os resultados apontem para uma melhora da eficiência antioxidante do exercício quando associado a terapia de fotobiomodulação, nosso estudo poderia ter obtido resultados mais concretos se houvesse uma comparação com exercício agudo e treinamento em esteira cerca de 8 semanas, as análises ainda poderiam ter incluído investigação sobre nitro estresse oxidativo.

Diante do exposto e dos resultados obtidos, podemos concluir que o exercício aeróbio associado a terapia de fotobiomodulação na dose de 2 joules apresentou melhores resultados quando comparado com o grupo RA, o tratamento foi eficiente na redução da peroxidação lipídica e também aumentou as atividades antioxidantes de SOD, GPX e CAT. O exercício aeróbio associado a terapia de FBM pode ser uma alternativa no tratamento da artrite reumatóide.

## **CONCLUSÃO**

Concluimos que a terapia de fotobiomodulação associada ao exercício físico moderado aumenta a expressão proteica da SOD, GPx e CAT e diminui TBARS na AR. O exercício físico moderado pode modular estresse oxidativo. A terapia de fotobiomodulação na dose de 2 joules associada ao exercício físico foi mais eficaz na modulação do estresse oxidativo.

## Referências

1. Hadi, V., Kheirouri, S., Alizadeh, M., Khabbazi, A., & Hosseini, H. (2016). Effects of *Nigella sativa* oil extract on inflammatory cytokine response and oxidative stress status in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(1), 34–43.
2. Lu QY, Han QH, Li X, Li ZC, Pan YT, Liu L, Fu QG. (2014) Analysis of differentially expressed genes between rheumatoid arthritis and osteoarthritis based on the gene co-expression network. *Mol Med Rep*. 10(1):119-24.
3. Quiñonez-Flores, C. M., González-Chávez, S. A., Del Río Nájera, D., & Pacheco-Tena, C. (2016). Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *BioMed Research International*, 2016, 6097417.
4. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS, Hamza AB. (2016) Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. *Free Radic Biol Med*. S0891-5849(16)30308-2.
5. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26.
6. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G.; (2009). Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2009 Apr;12(1):29-33.
7. Tuna, Z., Duger, T., Atalay-Guzel, N., Aral, A., Basturk, B., Haznedaroglu, S., & Goker, B. (2015). Aerobic exercise improves oxidant-antioxidant balance in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Physical Therapy Science*, 27(4), 1239–1242.
8. He F, Li J, Liu Z, Chuang CC, Yang W, Zuo L. Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise (2016). *Front Physiol*. 7;7:486.
9. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 222:283-92.
10. Cruzat, Vinicius Fernandes, Rogero, Marcelo Macedo, Borges, Maria Carolina, & Tirapegui, Julio. (2007). Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 13(5), 336-342.

11. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA.,(2012). Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med.*;1(4): 267-286.
12. Leal-Junior EC, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho Pde T, Dal Corso S, Bjordal JM.; (2015). Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci.*;30(2): 925-939.
13. Leal-Junior EC, Lopes-Martins RA, Frigo L, De Marchi T, Rossi RP, de Godoi V, 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- 532.
14. de Almeida P, Lopes-Martins RA, De Marchi T, Tomazoni SS, Albertini R, Corrêa JC, et al.; (2012). Red (660 nm) and infrared (830 nm) low-level laser therapy in skeletal muscle fatigue in humans: what is better? *Lasers Med Sci.*;27(2): 453-458.
15. Sussai DA, Carvalho Pde T, Dourado DM, Belchior AC, dos Reis FA, Pereira DM.; (2010). Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci.*;25(1): 115-120.
16. Santos LA, Marcos RL, Tomazoni SS, Vanin AA, Antonialli FC, Grandinetti Vdos S, et al.; (2014). Effects of pre-irradiation of low-level laser therapy with different doses and wavelengths in skeletal muscle performance, fatigue, and skeletal muscle damage induced by tetanic contractions in rats. *Lasers Med Sci.*; 29(5): 1617-1626.
17. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, González-Gallego J. (2005) Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* Oct;37(4):293-300.
18. Firat ET, Dağ A, Günay A, Kaya B, Karadede Mİ, Ersöz Kanay B, Ketani A, Evliyaoğlu O, Uysal E. (2014)The effect of low-level laser therapy on the healing of hard palate mucosa and the oxidative stress status of rats. *J Oral Pathol Med.*43 (2):103-10.
19. Servetto N, Cremonezzi D, Simes JC, Moya M, Soriano F, Palma JA, et al. (2010) Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. *Lasers Surg Med.* 42(6): 577-583.
20. Guaraldo SA, Serra AJ, Amadio EM, Antônio EL, Silva F, Portes LA, Tucci PJ, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T (2016) The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and

- functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise. *Lasers Med Sci.* 31(5):833-40.
21. Silva AA, Leal-Junior EC, D'Avila Kde A, Serra AJ, Albertini R, França CM, Nishida JA, de Carvalho Pde T (2015) Pre-exercise low-level laser therapy improves performance and levels of oxidative stress markers in mdx mice subjected to muscle fatigue by high-intensity exercise. *Lasers Med Sci.* 30(6):1719-27. doi: 10.1007/s10103-015-1777-7.
  22. Lisa K. Stamp, Irada Khalilova, Joanna M. Tarr, Revathy Senthilmohan, Rufus Turner, Richard C. Haigh et al; (2012). Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumat.* 51:17961803.
  23. Mohammad Hosein Farzaeia, Fatemeh Farzaeib, Mohammad Abdollahid, Zahra Abbasabadia, Amir Hossein Abdolghaffarie, Bahman Mehraban; ( 2016 ). A mechanistic review on medicinal plants used for rheumatoid arthritis in traditional Persian medicine. *J. of Pharmacy and Pharmacol.*
  24. Somaiya Mateen, Shagufta Moin, Abdul Qayyum Khan, Atif Zafar, Naureen Fatima; (2016). Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *Plos one J.pone.0152925* April 4,.
  25. Wanida Sukketsiri, Pennapa Chonpathompikunlert, Supita Tanasawet, Nutjanat Choosri, Tulaporn Wongtawatchai; (2016). Effects of *Apium graveolens* Extract on the Oxidative Stress in the Liver of Adjuvant-Induced Arthritic Rats. *Prev. Nutr. Food Sci.* 21(2):79-84.
  26. Carol A Hitchon, Hani S El-Gabalawy (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 6:265-278.
  27. Pisetsky, D. S.; Ward, M. M.; (2012) Advances in the treatment of inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 26 (2), 251-61.
  28. Agarwal, S. K.; (2011). Biologic agents in rheumatoid arthritis: An update for managed care professionals. *J Manag Care Pharm.* 17 (9 Suppl B), S14-8.
  29. Lidiane Isabel Filippin, Rafael Vercelino, Norma Possa Marroni, Ricardo Machado Xavier; (2008). Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. *Rev Bras Reumatol*, v. 48, n.1, p. 17-24.
  30. Silveira PCL, Silva LA, Tuon T, Freitas TP, Streck EL, Pinho RA; (2009). Effects of low-level laser therapy on epidermal oxidative response induced by wound healing. *Rev Bras Fisioter.*;13(4):281-7.

31. Mirjana Veselinovic, Nevena Barudzic, Milena Vuletic, Vladimir Zivkovic, Aleksandra Tomic-Lucic, Dragan Djuric, Vladimir Jakovljevic; (2014). Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis Patients: Relationship to Diseases Activity. *Mol Cell Biochem* 391:225–232.
32. Laurindo IMM, Ximenes AC, Lima FAC, Pinheiro GRC, Batistella LR, Bertolo MB et al; (2004). Artrite Reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. *Rev Bras Reumatol*, p . 435-42.
33. Kiriague Barra Ferreira Barbosa, Neuza Maria Brunoro Costa, Rita de Cássia Gonçalves Alfenas, Sérgio Oliveira de Paula, Valéria Paula Rodrigues Minim, Josefina Bressan; (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr*, 23(4):629-643.
34. Vanessa Krüger Engers, Camile Saul Behling, Matias Nunes Frizzo; (2011). A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. *Rev. Context. & Saúde*, v. 10 , n. 20.
35. Felipe Martelli., Francis Morais Franco Nunes; (2014). Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Cienc. Cult.* vol.66, n.3, pp. 54-57.
36. Green K, Brand MD, Murphy MP; (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 53 (Suppl 1): 110-8.
37. Javeshghani D, Magder S.A, Barreiro E, Quinn M.T, Hussain S.N; (2002). Molecular characterization of a superoxide-generating NADPH oxidase in the ventilatory muscles. *J. Respir Crit Care Med.*165(3):412-8.
38. Zoppi C.C, Antunes N.J, Catanho F.O, Goulart L.F, Moura N.M, Macedo D.V; (2003). Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev. Paul. Educ. Fís.* 17(2): 119-30.
39. Urso M.L, Clarkson P.M; (2003). Oxidative Stress, Exercise, and Antioxidant Supplemen. *Tox.* 89(1-2):41-54.
40. Mc Anulty, S.R, Mcanulty, L.S, Nieman, D.C, Morrow, J.D, Utter A.C; Dumke, C.L; (2005). Effect of resistance exercise and carbohydrate ingestion on oxidative stress. *Free Radic Res.* 39(11):1219-24.
41. Shankarlal L Sharma; Shobha A.Chokshi; Chandan Chakraborti; (2014). Enzymatic Antioxidants, Malondialdehyde, and Total Antioxidant Activity as Markers of Oxidative-Stress in Arthritis and Rheumatoid Arthritis. *NHL J. of Med. Sciences//Vol 3/Issue 2*.
42. Powers S.K.; Ji L.L.; Leeuwenburgh C; (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* Jul;31(7):987-97.

43. Drodge, W; (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. v.82. p.47-95.
44. Metin, G.; Gumustas, M.K.; Belce, A.; Kayserilioglu, A.; (2003). The effect of regular swimming exercise on vitamin E supplemented male rats. *Arch Physiol Biochem*. Jul;111(3):215-6.
45. Powers, S.K.; Jackson, M.J.; (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. Oct; 88(4):1243-76.
46. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C.; (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*. Ox.: Clarendon Press, 543 p.
47. Ramel A.; Wagner K.H.; Elmadfa I.; (2004). Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *Eur J Nutr*. Feb;43(1):2-6.
48. Lekhi, C.; Gupta P.H.; Singh, B.; (2007). Influence of exercise on oxidant stress products in elite Indian cyclists. *Br J Sports Med*. Oct;41(10):691-3.
49. Teixeira, M.J.; (2009). Challenges in the treatment of neuropathic pain. *Drugs Today (Barc)*. Oct;45 Suppl C:1-5. Portuguese.
50. Águida Cristina Gomes Henriques; Claudia Cazal; Jurema Freire Lisboa de Castro.; (2010). Low intensity laser therapy effects on cell proliferation and differentiation. Review of the literature. *Rev. Col. Bras. Cir.*; 37(4): 295-302.
51. Chung, H.Y.; Cesari, M.; Anton, S.; Marzetti, E.; Giovannini, S.; Seo, A.Y.; Carter, C.; Yu, B.P.; Leeuwenburgh, C.; (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. Jan; 8 (1): 18-30.
52. Ela Tules Firat; Ahmet Dag; Ahmet Gu'nay; Beyza Kaya; Mehmet Irfan Karadede; Berna Erso'z Kanay; Aydin Ketani; et al.; (2013). The Effects of Low-Level Laser Therapy on Palatal Mucoperiosteal Wound Healing and Oxidative Stress Status in Experimental Diabetic Rats. *Photomed. and Las. Surgery*. Pp. 315–321.
53. Beatriz Guimarães Ribeiro; Agnelo Neves Alves ;Lucas Andreo Dias dos Santos; Tatiane Matarazzo Cantero; Kristianne Porta Santos Fernandes; Danielle da Silva et al.; (2016). Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury withor without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. *Plos One /journal.pone.0153618*.

54. Juliana Aparecida de Almeida Chaves Piva; Elizângela Márcia de Carvalho Abreu; Vanessa dos Santos Silva; Renata Amadei Nicolau.; (2011). Effect of low-level laser therapy on the initial stages of tissue repair: basic principles. *An Bras Dermatol.*;86(5):947-54.
55. Tuby, H.; Maltz, L.; Oron, U.; (2007). Low-level laser irradiation promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 39(4): 373-378.
56. Stein A.; Benayanu D.; Maltz L.; (2005). Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* Apr;23(2):161-6.
57. Hawking, H.D.; Abrahamse, H.; (2006). Effect of mutiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblast. *Photomed Laser Surg.* 24(6): 705-714.
58. Livia Assis; Ana I.S. Moretti; Thalita B. Abrahao; Vivian Cury; Heraldo P. Souza; Michael R. Hamblin, et al.; (2012). Low-Level Laser Therapy (808 nm) Reduces Inflammatory Response and Oxidative Stress in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion. *Las. in Surg. and Medicine* 44:726–735.
59. Aline Barbosa Macedo ;Luis Henrique Rapucci Moraes; Daniela Sayuri Mizobu; Aline Reis Fogaça; Fernanda dos Santos Rapucci Moraes;Tulio de Almeida Hermes, et al; (2015). Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity Inflammation Response and Oxidative Stress. *Plos One journal.pone.0128567* June 17.
60. Flávia Mafra de Lima; Regiane Albertini; Yvana Dantas; Antonio Luis Maia-Filho; Cristiano de Loura Santana; Hugo Caire Castro-Faria-Neto, et al; (2013). Low-Level Laser Therapy Restores the Oxidative Stress Balance in Acute Lung Injury Induced by Gut Ischemia and Reperfusion. *Photochemistry and Photobiology*, 89: 179–188.
61. Helina Moges; Olavo M. Vasconcelos; William W. Campbell; Rosemary C. Borke; Jennifer Anne McCoy; Lauren Kaczmarczyk, et al; (2009). Light Therapy and Supplementary Riboflavin in the SOD1 Transgenic Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (FALS). *Las. in Surg. and Medicine* 41:52–59.
62. Lubart; r.; Eichler, M.; Lavi, r.; Friedman, h.; Shainberg, A.; (2005). Low-energy laser Irradiation Promotes Cellular Redox Activity. *Photomed Laser Surg* 23:3–9.
63. José Carlos Tatmatsu Rocha, Cleber Ferraresi, Michael R. Hamblin, Flávio Damasceno Maia, Nilberto Robson Falcão do Nascimento, Patricia Driusso et al. (2016). Low-level laser therapy (904 nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. *J. of Photochem. & Photobiol. B: Biology* 164, 96–102.



64. Huang, Y.Y.; Chen, A.C.; Carroll, J.D.; Hamblin, M.R.; (2009). Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. *Dose Response*; 7:358–383.
65. Liu X.G.; Zhou, Y.J.; Liu, T.C.; Yuan, J.Q.; (2009). Effects of Low-Level Laser Irradiation on Rat Skeletal Muscle Injury After Eccentric Exercise. *Photomed Las. Surg.*; 27(6):863–9.
66. Paulo Cesar Lock Silveira, Luciano A. Silva, Tiago P. Freitas, Alexandra Latini, Ricardo A. Pinho; (2011). Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci* 26:125–131.
67. Basso, F.G.; pansani, T.N.; turrioni, A.P.; bagnato, V.S.; hebling, J.; De Souza Costa, C.A.; (2012). In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent*.719452.
68. Rodrigo Silva Macedo, Mayara Peres Leal, Tarcio Teodoro Braga, Éric Diego Barioni, Stephanie de Oliveira Duro, Anna Carolina Ratto et al.; (2016). Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation*, Article ID 9303126.
69. L.F. Nonato, E. Rocha-Vieira, R. Tossige-Gomes, A.A. Soares, B.A. Soares, D.A. Freitas, M.X. Oliveira, et al.; (2016). Leite. Swimming training attenuates oxidative damage and increases enzymatic but not non-enzymatic antioxidant defenses in the rat brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 49(10): e5310.
70. Schneider, C.D, Oliveira, A.R.; (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. vol.10, n.4, pp. 308-313. ISSN 1517-8692.
71. Oliveira, A.R.; Schneider, C.D.;Ribeiro, J.L.; Deresz, L.F.; Barp, J.; Belló-Klein, A.; (2004). Oxidative stress after three different intensities of running. *Med Sci Sports Exerc.*; 35:S367.
72. Mastaloudis, A.; Leonard, S.W.; Traber, M.G.; (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med*. Oct 1;31(7):911-22.
73. Silveira, L.R.; (2004). Critical and methodological analyses on the determination of oxygen and nitrogen reactive species in skeletal muscle cells during contractions. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. Dec;48(6):812-22.

74. Vancini, R.L.; Lira, C.A.B.; Aboulafia, J. Nouailhetas, V.L.A.; (2005). Radical livre, estresse oxidativo e exercício. Centro de Estudos de Fisiol. do Exerc. UNIFESP.
75. Polidori MC, Mecocci P, Cherubini A, Senin U.; (2000). Physical activity and oxidative stress during aging. *Int J Sports Med.*;21:154-7.
76. Sem, C.K.; Packer, L.; (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr.* Aug;72(2 Suppl):653S-69S. Review.
77. Gerald Supinski.; (1998). Free radical induced respiratory muscle dysfunction. *Mol. and Cell. Biochemistry* 179: 99–110.
78. Granot, E.; Khohen, R.; (2004). Oxidative stress in childhood in health and disease states. *Clin Nutr.* Feb;23(1):3-11.
79. Vitala, 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.
80. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH (1997) Collagen-induced arthritis, an animal control of autoimmunity. *Life Sci.* 61:1861–1878. doi: 10.1016/S0024-3205(97)00480-3.
81. dos Santos SA, Alves AC, Leal-Junior EC, Albertini R, Vieira RP, Ligeiro AP, et al.; (2014). Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Las. Med. Science.*
82. Tao Tang; Takeshi Muneta; Young-Jin Ju; Akimoto Nimura; Kyosuke Miyazaki; Hiroyuki Masuda; et al.(2008) Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection. *Arthritis Research & Therapy.*
83. Gyeyeop Kim, Youngeok Kim, Eunjung Kim; (2013). Anti-inflammatory Effects of Low Intensity Laser Therapy on Adjuvant-induced Rheumatoid Arthritis in Rat. *J. Phys. Ther. Sci.* 25: 47–50.
84. Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, Myers LK, Brand DD. (2010) Collagen-induced arthritis. *Curr Protoc Immunol.* 15:Unit 15.5.1-25. doi: 10.1002/0471142735.im1505s89.
85. Alves AC, de Carvalho PT, Parente M, Xavier M, Frigo L, Aimbire F, et al.; (2013). Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. *Las. Med Sci.* Feb;28(2):529-36.

86. Alves, A. C. A., Vieira, R. de P., Leal-Junior, E. C. P., dos Santos, S. A., Ligeiro, A. P., Albertini, R., de Carvalho, P. de T. C. (2013). Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res. & Ther.* 15(5), R116.
87. Jorge Luis Costa Carvalho, Auriléia Aparecida de Brito, Ana Paula Ligeiro de Oliveira, Hugo Caire de Castro Faria Neto, Thiago Martini Pereira, Regiane Albertini de Carvalho, et al.; (2016). The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *Journal of Biophotonics* 1–14.
88. Young Gon Kim, Sok Cheon Pak, Sang Rok Lee.; (2000) Hairless Mouse Epidermal Antioxidants and Lipid Peroxidation Assessed by He-Ne Laser. *Las. in Surg. and Medicine* 27:420–426.
89. Wendel Luiz Pinho, Adriana Pederneiras Rebelo da Silva.; (2013). Efeitos do exercício físicosobre a formação de espécies reativas de oxigênio e os compostos antioxidantes da dieta. *Rev. Bras. de Nut. Esportiva, São Paulo.* v. 7. n. 37. p.77-87. Jan/Fev.
90. Lewan Parker, Nigel K. Stepto, Christopher S. Shaw , Fabio R. Serpiello , Mitchell Anderson , David L. Hare, Itamar Levinger.; (2016). Acute High-Intensity Interval Exercise-Induced Redox Signaling Is Associated with Enhanced Insulin Sensitivity in Obese Middle-Aged Men. *Front Physiol.* Sep 16;7:411.
91. Vassilakopoulos, T.; Deckman, G.; Kebbewar, M.; Rallis, G.; Harfouche, R.; Hussain, S.N.; (2003). Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*Mar;284(3):L452-7.
92. Chevion, S.; Moran, D.S.; Heled, Y.; Shani, Y.; Regev, G.; Abbou, B.; Berenshtein, E., Stadtman, E.R.; Epstein, Y.; (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29;100(9):5119-23.
93. Close, G.L.; Ashton, T.; Cable, T.; Doran, D.; Noyes, C.; Mcardle, F.; Maclaren, D.P. (2005). Effects of dietary carbohydrate on delayed onset muscle soreness and reactive oxygen species after contraction induced muscle damage. *Br J Sports Med.*;39(12):948-53.
94. Lekhi, C.; Gupta, P.H.; Singh, B.; (2007). Influence of exercise on oxidant stress products in elite Indian cyclists. *Br J Sports Med.*;41(10):691-3.
95. Allen, D.G.; Lamb, G.D.; Westerblad, H.; (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* ;88(1):287-332. Review.
96. Jackson, M.J.; (2008). Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators or muscle function. *Free Radical Biology & Medicine*, v.44, p.132-141.

97. Jacobs, R.A.; Donovan, E.L.; Robinson, M.M.; (2009). Parallels of snipe hunting and ROS research: the challenges of studying ROS and redox signalling in response to exercise. *J Physiol.* 1;587(Pt 5):927-8.
98. Cooper, D. M.; Radom-Aizik, S.; Schwindt, C.; Zaldivar JR., F.; (2007). Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. *Journal of Applied Physiology*, v.103, p.700-709.
99. Brooks, G.; (2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *Journal of Physiology*, v.587, n.23, p.5591- 5600.
100. Yuji Fujimaki, Tadashi Shimoyama, Qiang Liu, Takashi Umeda., Shigeyuki Nakaji, Kazuo Sugawara.;(2003). Low-Level Laser Irradiation Attenuates Production of Reactive Oxygen Species by Human Neutrophils. *J. of Clinical Las. Med. & Surg.*
101. Adam Bartos, Yohann Grondin, Magda E. Bortoni, Elisa Ghelfi, Rosalinda Sepulveda, James Carroll, Rick A. Rogers; (2016). Pre-conditioning with near infrared photobiomodulation reduces inflammatory cytokines and markers of oxidative stress in cochlear hair cells. *J. Biophotonics* 1–11.
102. Reggiani Vilela Gonçalves, Rômulo Dias Novaes, Marli do Carmo Cupertino, Bruna Moraes, João Paulo Viana Leite, Maria do Carmo Gouveia Peluzio et al; (2013). Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. *Las. Med Sci*, 28:383–390.