

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA**

JULIANA DE ALMEIDA PIRES

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO PERFIL DE EXPRESSÃO
DOS FATORES DE APOTOSE BCL2, BAX E CASPASE 3 CLIVADA APÓS
INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS.**

SÃO PAULO 2016

JULIANA DE ALMEIDA PIRES

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO PERFIL DE EXPRESSÃO
DOS FATORES DE APOTOSE BCL2, BAX E CASPASE 3 CLIVADA APÓS
INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina – Universidade Nove de
Julho – UNINOVE, para obtenção do título de Mestre
em Medicina.

Área de Concentração: Mecanismos de Lesão e
Reparo de Doenças Crônicas Não Transmissíveis.
Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

SÃO PAULO 2016

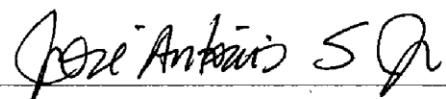
São Paulo, 03 de agosto de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

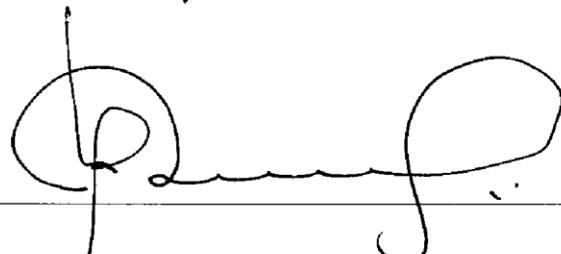
Aluna: Juliana de Almeida Pires

Título da Dissertação: **“Influência do laser de baixa intensidade no perfil de expressões dos fatores de apoptose BCL2, BAX e CAPASE 3 clivada após infarto do miocárdio em ratos”**

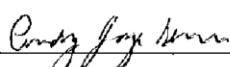
Presidente: Prof. Dr. José Antonio Silva Junior



Membro: Prof. Dr. Carlos Alberto Silva



Membro: Prof. Dr. Andrey Jorge Serra



DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Marina Pires e José Pires

À minha querida mãe...

...Por todos esses anos de companheirismo, carinho e dedicação. Pelas noites que passou acordada junto a mim. Pelo apoio em todos os momentos, principalmente nos difíceis. Esta tão sonhada conquista é sua também.

Ao meu pai...

...Pela estrutura e ensinamentos. Por ser o espelho de caráter e honestidade. “Há muros que só a paciência, derruba... Há pontes que só o carinho constrói”.

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a Deus...

...Primeiramente por ter me concedido saúde, paz e sabedoria. Por ter me guiado até a realização de mais esta etapa em minha vida. É através da fé que renovamos nossas forças, superamos obstáculos, alcançamos objetivos.

À Universidade Nove de Julho, pela oportunidade e por ter concedido as condições necessárias para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao José Antônio Silva Júnior, meu orientador, por ter me recebido e acolhido em sua equipe. A você meu respeito e agradecimento.

À Profa. Silvia Zamuner, sobretudo pela amizade. Pelas palavras de apoio e encorajamento nos momentos difíceis. Um exemplo de profissional e uma pessoa admirável.

À Profa. Dra. Stella Zamuner, não somente pela simpatia e auxílio, mas principalmente por permitir minha presença em seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Humberto Dellê, por sua gentileza e atenção. Sempre bem humorado e prestativo aos alunos.

Ao Prof. Dr. Cléber Camacho, pelos ensinamentos e atenção. És um exemplo de profissional.

À Martha Trindade e à Regiane Feliciano, pelo auxílio na realização dos testes.

Ao Eduardo Tadeu, pelo auxílio na manipulação dos animais e coleta dos tecidos.

Às técnicas do laboratório, Ângela e Samara, pelo apoio.

Às secretárias do mestrado, em especial à Andréia, pela dedicação e amizade.

Aos professores da UNINOVE. A união dos conhecimentos que foram adquiridos durante o curso permitiu a realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa. Meu muito obrigada!

À minha amiga Luciana Miato, pela dedicação e transmissão de seus conhecimentos. Aprendi muito com você.

Ao meu amigo Diego, pelo auxílio.

À minha cachorrinha Pink, pelo companheirismo, sempre ao meu lado enquanto escrevia esta tese.

Aos meus familiares, em especial meus sobrinhos Vinícius, Gustavo e Giuvana. Saibam que são muito importantes para mim. Amo vocês.

A todos que fizeram parte desta jornada, direta ou indiretamente.

Se um dia fecharem-lhe as portas da vida, pule a janela.

Augusto Cury

RESUMO

Influência do laser de baixa intensidade no perfil de expressão dos fatores de apoptose Bcl2, Bax e Caspase 3 clivada após infarto do miocárdio em ratos.

Os membros da família Bcl-2 são importantes reguladores apoptóticos. As proteínas Bcl-2 podem atuar ativando ou reprimindo a apoptose, podendo contribuir para o surgimento de patologias ou proteger o coração de diversas doenças cardíacas, respectivamente. A caspase-3 é uma protease efetora, cuja clivagem promoverá alterações que resultarão na morte da célula. A modulação de fatores apoptóticos, gerados pela oclusão coronariana e consequente morte celular, após a aplicação do laser de baixa intensidade ainda é pouco estudada. Utilizando modelo experimental, 15 ratas Wistar (200-280g) foram submetidas ao infarto do miocárdio pela oclusão da artéria coronária e randomizadas em três grupos: Controle (ratas controles); IM (ratas infartadas); IM+Laser (ratas infartadas e irradiadas com laser). No grupo IM+Laser, a área infartada foi tratada com laser (λ 660 nm, 15 mW de potência, 60 segundos, área irradiada 0.785 cm^2 , densidade de energia $22,5 \text{ J/cm}^2$, dose 1,1 Joules) após a oclusão coronariana. Os RNAs mensageiros de Bax e Bcl2 foram quantificados por PCR – Real Time (Sybr Green). A técnica de Western blotting foi conduzida para avaliar a expressão protéica de Bax, Bcl 2 e da caspase 3 clivada. Foi observado um aumento na expressão gênica, bem como proteica de Bcl 2 no grupo IM+Laser quando comparado com o grupo IM ($p \leq 0,05$), no entanto não se observou diferença significante na expressão gênica de Bax. Houve uma diminuição na expressão da protease caspase 3 no grupo IM+Laser em relação ao grupo infartado. Nossos resultados suportam a hipótese de que a laserterapia de baixa intensidade pode estimular a sobrevivência celular após o infarto, possivelmente por reduzir a apoptose da área viável do coração para manter a homeostase cardíaca após o infarto.

Descritores: apoptose, caspase 3, Bcl-2, Bax, infarto do miocárdio, laser de baixa intensidade.

ABSTRACT

Low intensity laser therapy modulation of Bcl2, Bax and Cleaved Caspase 3 apoptosis factors expression profile after myocardial infarction in rats.

Members of the Bcl -2 family are important apoptotic regulators. The Bcl -2 protein can act by activating or repressing apoptosis and may contribute to the emergence of diseases or protect the heart from various heart diseases, respectively. Caspase -3 is an effector protease which cleavage promotes changes that result in cell death. Modulation of apoptotic factors, generated by coronary occlusion and subsequent cell death, after the application of low intensity laser is little studied yet. Using an experimental model, 15 Wistar rats (200-280g) were subjected to myocardial infarction by coronary artery occlusion and randomized into three groups: control (control rats); IM (infarcted rats); IM + Laser (infarcted rats and irradiated with laser). In IM + Laser Group, the infarcted area was treated with laser (λ 660 nm, 15 mW, 60 seconds, irradiated area 0.785 cm², energy density 22,5 J/cm² and energy delivered 1,1 Joules) after coronary occlusion. The messenger RNAs of Bax and Bcl2 were quantified by PCR - Real Time (Sybr Green). The Western blotting procedure was conducted to evaluate the protein expression of Bax, Bcl2 and caspase 3. Was observed an increase in gene expression and protein of Bcl2 in IM + Laser group when compared to the IM group ($p \leq 0,05$), however no significant difference in gene expression of Bax was found. There was a decrease in the expression of cleaved caspase3 the IM group + Laser in relation to the infarcted group. Our results support the hypothesis that low level lasertherapy can stimulate cell survival after a heart attack, possibly by reducing apoptosis of viable area of the heart to maintain cardiac homeostasis after infarction

Key Words: apoptosis, caspase 3, Bcl-2, Bax, myocardial infarction, low level laser therapy.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Infarto Agudo do Miocárdio	19
2.2 Remodelação Miocárdica	19
2.3 Apoptose miocárdica	21
2.3.1 As Caspases – Iniciadoras e Executoras da Apoptose	23
2.4 Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos	31
2.5 Laser de Baixa Intensidade (LBI)	32
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivo Específico	37
4. MÉTODOS	39
4.1 O Modelo Experimental	39
4.1.1 Preparo dos animais	39
4.2 Grupos Experimentais	39
4.3 Produção da Técnica de Oclusão Coronária	40
4.4 Irradiação do Laser	41
4.5 Análise da Expressão Gênica	42
4.5.1 Coleta de material biológico – Tecido	42
4.5.2 Procedimentos – PCR	42
4.6 Ensaio para expressão de proteínas <i>Bax</i> e <i>Bcl-2</i>	45
4.7 Análise Estatística	46
5. RESULTADOS	48
5.1 Análise de Expressão Gênica	48
5.2 Alterações na Expressão Proteica de <i>Bax</i> e de <i>Bcl-2</i> após Irradiação do LBI	
49	
5.3 Mudanças na Expressão Proteica da Caspase-3 clivada	50
6. DISCUSSÃO.....	53 7.
CONCLUSÃO	56 8.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
LISTA DE TABELAS	

Tabela 1: Principais diferenças entre necrose e apoptose.....24

Tabela 2: Sequências de *primers* dos genes utilizados.....46

Tabela 3: Quantificação de RNA extraído das amostras de tecidos cardíacos dos animais submetidos à Oclusão da Artéria Coronária após três dias.....49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquematização da ativação das caspases.....26

Figura 2: Via extrínseca da apoptose.....28

Figura 3: Via intrínseca da apoptose.....31

Figura 4: Indução do infarto experimental. Exteriorização do coração para sutura coronária a 3 mm da origem, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar.....42

Figura 5: Irradiação do laser. Dispositivo a uma distância aproximada de 5 cm do ventrículo esquerdo.....43

Figura 6: Expressão de mRNA de Bax e Bcl-2 sobre o tecido do miocárdio após laserterapia por ensaio de PCR em Tempo Real.....50

Figura 7: Perfil de expressão de Bcl-2 e Bax pós-irradiação por Western Blot.....51

Figura 8: Perfil de expressão da Caspase-3.....52

LISTA DE SIGLAS, ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

µg - Microgramas µL-

Microlitro

ANOVA – Análise de variância

Apaf-1 - Protease apoptótica ativadora de fator 1

AIF – Fator indutor de apoptose

Bax - B cell lymphoma 2- assopciated protein X

Bcl-2 - B-cell lymphoma 2

Bid - BH3 interacting-domain death agonist

Caspases - Cysteine-dependent aspartate-directed proteases

CAD – Caspase activated DNase cDNA – DNA

Complementar DCV – Doenças cardiovasculares

DE – Densidade de energia

DEPC –Dietilpirocarbonato

DIC – Doenças isquêmicas do coração

DISC - Complexo de sinalização de indução de morte

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DP - Densidade de potência

DR - Receptores de morte

Fas - TNF receptor superfamily, member 6

FADD - Domínio de morte FAS-associada

FEVE - Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

IAM - Infarto agudo do miocárdio

IAPs – Inhibitor of apoptosis protein

IC - Insuficiência cardíaca

ICAD – Inhibitor of caspase activated DNase

IM - Infarto do Miocárdio

LBI – Laserterapia de Baixa Intensidade

mg - Miligrama mL- Mililitro

mm – Milímetro

mdm - 2 – Murine double minute nm

- Nanômetro

OAC – Oclusão da artéria coronária pb

- Pares de bases

qRT PCR - Transcrição reversa Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro rpm

- rotações por minuto

RT – Transcrição reversa

Smac/DIABLO - Segundo ativador mitocondrial de caspases/proteína de ligação direta

ao IAP com baixo PI TNF- Fator de necrose tumoral

TNFR - Receptor do fator de necrose tumoral

VE - Ventrículo esquerdo

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) assumem papel preponderante como causa de morbi-mortalidade no Brasil, responsáveis por 29,4% de todas as mortes registradas no país em um ano e representando um total de aproximadamente 308 mil óbitos, de acordo com dados do Ministério da Saúde. A alta prevalência do problema coloca o Brasil entre os 10 países com maior índice de mortes por DCV.

As Doenças Isquêmicas do Coração (DIC) e a Insuficiência Cardíaca (IC) são responsáveis por 39% das mortes por DCV, dentre estas a grande maioria relacionada a infarto agudo do miocárdio (IAM). Além disso, geram grande número de internações, representando, portanto, um problema de saúde pública.

A perda parcial do miocárdio após evento isquêmico agudo caracteriza o infarto do miocárdio (IM), com o aparecimento de disfunção contrátil do órgão. O grau desta disfunção irá determinar a evolução para a IC.

O estudo do IM é de extrema importância. Dados epidemiológicos revelam taxas de mortalidade geral em torno de 30%, dos quais aproximadamente 50% vão a óbito nas primeiras duas horas do evento e outros 14% morrem antes mesmo de receber atendimento médico (TUNSTALL-PEDOE et al., 1999). A insuficiência cardíaca (IC), caracterizada pelo comprometimento da capacidade do coração de suprir as necessidades do organismo, é considerada uma síndrome clínica de grande complexidade e com elevada prevalência. Embora mais comum em idosos, onde há estimativa de 80% das internações de indivíduos com mais de 65 anos, a doença acomete todas as idades (TRESCH, 1997). Pode evoluir sem manifestações clínicas por longo período, sendo alvo de significante morbidade, pois após o aparecimento dos sintomas, aproximadamente 50% dos indivíduos vão a óbito em cinco anos (LEVY et al., 2002; ROGER et al., 2004). O IM é tido como a causa mais comum de remodelamento e IC. Várias situações podem levar ao remodelamento cardíaco, tanto fisiológicas, quanto patológicas (COHN, 2000), porém, o termo é comumente utilizado para se referir a situações de caráter patológico. Neste sentido, descreve alterações morfológicas, moleculares, gênicas e celulares decorrentes de uma lesão ao coração, que podem se expressar clinicamente por alterações do tamanho, forma e função deste órgão (MITTMANN et al., 1998; SWYNGHEDAUW, 1999). Com isto, modificações na estrutura, forma e função dos cardiomiócitos (hipertrofia e depressão da contração e do relaxamento), da matriz extracelular (fibrose intersticial e perivasicular) e dos vasos sanguíneos (redução da capilaridade, hipertrofia da

musculatura lisa, disfunção vascular) são observadas. Essas alterações, embora sejam algumas vezes consideradas como mecanismos compensatórios, na sua progressão tornam-se substrato da disfunção ventricular, dos sintomas de IC e das mortes relacionadas a essa doença (MITTMANN et al., 1998; SWYNGHEDAUW, 1999).

Na IC, a perda de cardiomiócitos era tradicionalmente atribuída à necrose, com base em observações morfológicas de miócitos mortos e substituição por tecido fibrótico. Atualmente sabe-se que a apoptose está envolvida em diversas condições patológicas, incluindo o IAM, a aterosclerose e estágio final da cardiomiopatia hipertrófica (BARDALES et al., 1996; SARASTE et al., 1997). No entanto, estes últimos achados somente tornaram-se possíveis com a introdução das técnicas de TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling), onde se pode observar a fragmentação do material genômico. Desta forma, ambos os mecanismos de morte celular podem ser observados no evento isquêmico, onde a morte celular programada participa de forma ativa no processo do remodelamento após o IAM (KAJSTURA et al., 1996; PALOJOKI et al., 2001).

A apoptose ou morte celular programada é, por definição, um tipo de “autodestruição celular”, com funcionalidade oposta a mitose. Assim, é tida como um acontecimento comum, necessário para a regulação da homeostasia do organismo vivo. Embora presente em situações fisiológicas, como no desenvolvimento embrionário, por exemplo, atua também em situações patológicas, ao participar de processos inflamatórios e disfunções orgânicas (THOMPSON, 1995). Em decorrência de uma desregulação da homeostase, a apoptose leva ao surgimento de diversas patologias como doenças autoimunes e neurodegenerativas, além do câncer e processos degenerativos crônicos, onde se enquadram as doenças cardiovasculares (STELLER, 1995; THOMPSON, 1995). Embora os recursos básicos para a realização da apoptose pareçam estar presentes em todas as células de mamíferos, sinais intra e extracelulares são necessários para sua ativação.

Vários são os genes envolvidos no controle da apoptose, como por exemplo, o p53, c-myc, entre outros. Porém, muitos estudos apontam os genes da família Bcl-2 como importantes reguladores apoptóticos (GUSTAFSSON, GOTTLIEB, 2007; CHENG et al., 1996; SCHWARZ et al., 2006).

A descoberta do papel da apoptose em diversas doenças, como no IM, propicia o desenvolvimento de novas perspectivas terapêuticas, com o propósito de controlar

os eventos apoptóticos. O laser de baixa intensidade (LBI) surge como uma opção de tratamento.

Apesar do mecanismo de ação do laser, denominado biomodulação, ainda não ser bem definido, acredita-se que esse tipo de radiação tem a capacidade de promover alterações no metabolismo celular, estimulando ou inibindo atividades fisiológicas, proliferativas e bioquímicas. O princípio envolvido é o efeito foto-físicoquímico, em que a luz do laser interage a nível biomolecular (BASFORD, 1989; KARU, 1999; CHAVANTES, 2008).

Em estudos do nosso grupo (BORTONE et al., 2008 e SILVA et al., 2011), observou-se diminuição da expressão de mediadores inflamatórios pela laserterapia, levando a redução do processo inflamatório. De acordo com Manchini et al. (2014), o laser pode diminuir a inflamação, facilitando a sobrevivência celular e cicatrização pós-infarto, contribuindo no remodelamento cardíaco adverso após IM. Contudo, há poucos trabalhos relatando os efeitos do laser sob o miocárdio remanescente ao infarto.

Diante do exposto, fica evidente que diversos mecanismos envolvidos no IM podem levar a danos irreversíveis e consequente progressão para a IC. Dentre estes, a apoptose é um dos mecanismos determinantes, onde a compreensão da regulação de fatores anti-apoptóticos e pró-apoptóticos, nos levará a novas descobertas terapêuticas.

Em virtude das crescentes evidências a respeito dos benéficos da laserterapia, foi proposta a realização deste trabalho, objetivando a investigação da ação do LBI na regulação do fator apoptótico Bax e anti-apoptótico Bcl-2, bem como da protease caspase-3.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infarto Agudo do Miocárdio

A composição do coração é caracterizada por elementos essenciais, como os vasos e matriz intersticial colágena, bem como por células cardíacas, dentre as quais estão os cardiomiócitos, mastócitos, células endoteliais e musculares lisas. O que irá determinar a manutenção morfológica e fisiológica deste órgão será o equilíbrio desses compartimentos (WEBER, 2000). Assim como a maior parte das células do corpo humano, os cardiomiócitos são células diferenciadas, correspondendo a aproximadamente 70 a 80% do total dos constituintes do coração (MAGALHÃES et al., 2008). A morte dos cardiomiócitos resultante de um evento isquêmico leva à fibrose do músculo cardíaco. Tal fato é atribuído ao próprio processo de diferenciação dessas células, que param de se multiplicar nos primeiros anos de vida de um indivíduo por tornarem-se adultas, ou seja, altamente diferenciadas. Desta forma, o crescimento do coração, desde a infância até a idade adulta, ocorrerá em consequência de hipertrofia e não de hiperplasia celular (SCORSIN, GUARITA-SOUZA, 2001). A hipertrofia cardíaca é considerada um mecanismo de adaptação, onde o órgão apresenta aumento de massa e peso em consequência do aumento de seu volume ou da quantidade de seus constituintes (MORGAN, BAKER, 1991).

2.2 Remodelação Miocárdica

O miocárdio exposto à sobrecarga tem como resposta o aumento da massa muscular. Esse mecanismo de hipertrofia cardíaca tem caráter adaptativo, para que o órgão consiga suprir as demandas do organismo. Neste sentido, diferenças são observadas em relação ao crescimento fisiológico normal do miocárdio e à hipertrofia, que envolve desde alterações morfológicas até a modificação de seus constituintes. Esse aumento observado da cavidade ventricular de corações infartados resulta, portanto, de uma sobrecarga anormal, ou ainda, de eventos isquêmicos ou inflamatórios (COHN et al., 2000; OLIVEIRA, FRANCISCHETTI, 2006). A causa desse

aumento difere, também, em relação às fases da injúria, onde inicialmente a dilatação é decorrente do processo de amplificação do infarto e, numa fase mais tardia, o aumento da cavidade ventricular deve-se à hipertrofia (ZORNHOFF et al., 2009).

O termo remodelação, remodelamento ou remodelagem, referindo-se à isquemia miocárdica foi utilizado pela primeira vez em 1982, em um trabalho que abordava a substituição do tecido necrótico infartado por tecido fibrótico (HOCKMAN, BULKLEY, 1982). Após alguns anos, em 1985, Janice Pfeffer utilizou este termo em sentido mais amplo, para se referir ao aumento da cavidade ventricular após infarto experimental em ratos (PFEFFER et al, 1985). Em estudo realizado por Pfeffer e Braunwald (1990) a expressão foi referida a alterações morfológicas que ocorriam após o IAM, com o aumento do ventrículo esquerdo, ocasionando em disfunção ventricular.

Atualmente, a remodelação miocárdica se caracteriza por um conjunto de alterações que seguem a lesão cardíaca, e que envolve a modificação em nível celular e molecular, resultando em mudança no tamanho, dimensão e função do coração (COHN, SHARPE, 2000; FRANCIS, 2001). De forma simultânea, ocorre a necrose das fibras musculares e decomposição do colágeno interfibrilar, ocasionando na perda do tecido de sustentação e deixando a região suscetível a deformações. Na expansão da área infartada, há um deslizamento de áreas musculares que sofreram necrose, que leva os cardiomiócitos a se realinhar na parede infartada, resultando em afilamento da região que sofreu a lesão e dilatação do ventrículo (MATSUBARA, ZORNHOFF, 1995). Em termos funcionais, a perda do músculo contrátil após o evento isquêmico resulta em diminuição do volume ejetado, com aumento do volume sistólico e diastólico final e consequente dilatação do ventrículo esquerdo (ZORNHOFF et al., 2009). A contratilidade do tecido tende a ser restaurada, porém, numa fase mais tardia, com a remodelagem ventricular, ocorrem alterações genéticas, estruturais e bioquímicas, que levarão a perda da capacidade funcional do coração, instituindo a insuficiência cardíaca (PFEFFER, BRAUNWALD, 1990; FRANCIS, 2001; ZORNHOFF, SPADARO, 1997).

Embora os mecanismos envolvidos no fenômeno da remodelação ventricular ainda não estão completamente esclarecidos, uma das características mais acentuadas é a alteração no perfil de expressão de diversas proteínas, com o aumento ou a reexpressão de genes do período fetal. Acredita-se que a expressão gênica fetal seja, portanto, um marcador, relacionado à progressão da remodelação miocárdica

(FRANCIS, 2001; SWYNGHEDAUW, 1999). Dentre os diversos fatores que podem estar relacionados à progressão do remodelamento, tem-se a morte celular, que ocorre por mecanismos distintos, conhecidos como apoptose, autofagia e necrose. Embora não se conheça o papel exato desses mecanismos na remodelação, acredita-se que a morte progressiva dos cardiomiócitos esteja envolvida na perda da função contrátil do coração, após o IAM (TAKEMURA, FUJIWARA, 2004).

Após lesão no miocárdio, uma reativação do programa fetal pode induzir a apoptose. A sinalização, que seria para as células progredirem em seu ciclo normal não ocorre nos cardiomiócitos, por estes serem células diferenciadas, ativando o mecanismo de morte celular (BALDI et al., 2002; DIEZ, 1998).

Baldi et al (2002), em estudo de necropsias em humanos com IAM, relataram a presença de morte celular programada em tecido sadio na fase crônica do infarto e, sugeriram ainda, que a apoptose pode estar envolvida no acometimento morfológico do coração, devido sua presença em evidências de dilatação e disfunção ventricular.

2.3 Apoptose miocárdica

Desde 1972, quando Kerr et al. propuseram o termo “apoptose” para designar um tipo morfológicamente distinto de morte celular, o conceito passou a despertar o interesse de pesquisadores. Relacionada com a homeostase da regulação fisiológica, atua de forma contrária à mitose, estabelecendo, portanto, um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular programada. Contudo, desempenha importante papel também em patologias, estando envolvida em diversos processos degenerativos crônicos, como as doenças cardiovasculares, incluindo o IM, a aterosclerose e o remodelamento cardíaco após IM (HAUNSTETTER, IZUMO, 1998).

A apoptose difere da necrose celular em muitos aspectos. A morte accidental ou necrose é considerada uma resposta passiva às injúrias letais, tais como traumas e eventos isquêmicos. Os danos são irreversíveis e as células que sofrem o insulto irão apresentar alterações morfológicas, tais como aumento do volume celular, agregação da cromatina e clivagem desordenada do DNA, desorganização do citoplasma, interrupção da síntese protéica, perda da integridade da membrana plasmática e degeneração das mitocôndrias, com consequente ruptura celular. A liberação de

substâncias intracelulares causa dano às células vizinhas e reação inflamatória (THOMPSON, 1995; STELLER, 1995; ORRENIUS, 1995; CAFFORIO, 1996). Morfologicamente, as células apoptóticas apresentam uma diminuição de seu volume (citoplasma denso e organelas mais próximas), cromatina condensada (massas densas agregadas à periferia do núcleo) e a maioria das organelas citoplasmáticas conservadas, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa; ocorre a degradação do DNA pela ação de endonucleases (cromatina fragmentada em oligossomos de vários tamanhos, correspondentes a múltiplos de 180- 200 pares de bases); há formação de bolhas citoplasmáticas e o núcleo sofre fragmentação, originando “corpos apoptóticos”, contendo cromatina fragmentada e organelas, envoltos por uma membrana. O processo exige consumo de energia e não atinge as células vizinhas, pois os corpos apoptóticos sofrem fagocitose. Desta forma, a apoptose caracteristicamente não está associada com infiltração de células inflamatórias, diferentemente do que ocorre na necrose (WYLLIE, 1994; THOMPSON, 1995; STELLER, 1997; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). A tabela 1 ilustra as principais diferenças entre a necrose e a morte celular programada.

As alterações morfológicas que ocorrem nas células apoptóticas são o reflexo de uma cascata de eventos bioquímicos que terminam por ativar uma família de proteases, conhecidas como caspases.

Tabela 1 – Principais diferenças entre necrose e apoptose

NECROSE	APOTOSE
Processo patológico	Evento fisiológico e patológico
Ocorre em grupo de células	Ocorre em células isoladas
Degradação do núcleo	Redução do volume celular
Perda da integridade da membrana	Membrana celular íntegra
Perda precoce da função	Perda tardia da função
Degradação do DNA:	Degradação do DNA:
Aleatório, Danos por Radicais livres	Internucleossomal, ativação gênica, endonuclease
Reação tissular:	Reação tissular:
Com inflamação	Sem inflamação, fagocitose de corpos apoptóticos

2.3.1 As Caspases – Iniciadoras e Executoras da Apoptose

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) são um grupo de proteases com função determinante na apoptose, e consequentemente, constituem

alvos terapeuticamente atrativos como atuantes em sua inibição ou ativação. Encontram-se no citoplasma celular sob a forma inativa e pertencem à família das cisteínas proteases, que possuem uma cisteína como sítio ativo. Reconhecem e clivam várias proteínas e substratos vitais, que tenham como resíduo o aminoácido aspartato (NICHOLSON, THORNBERRY, 1997). A clivagem dos substratos leva à condensação e fragmentação do núcleo, e a alteração da membrana celular resulta em sinalização para a fagocitose promovida pelos macrófagos (BOATRIGHT, SALVESEN, 2003).

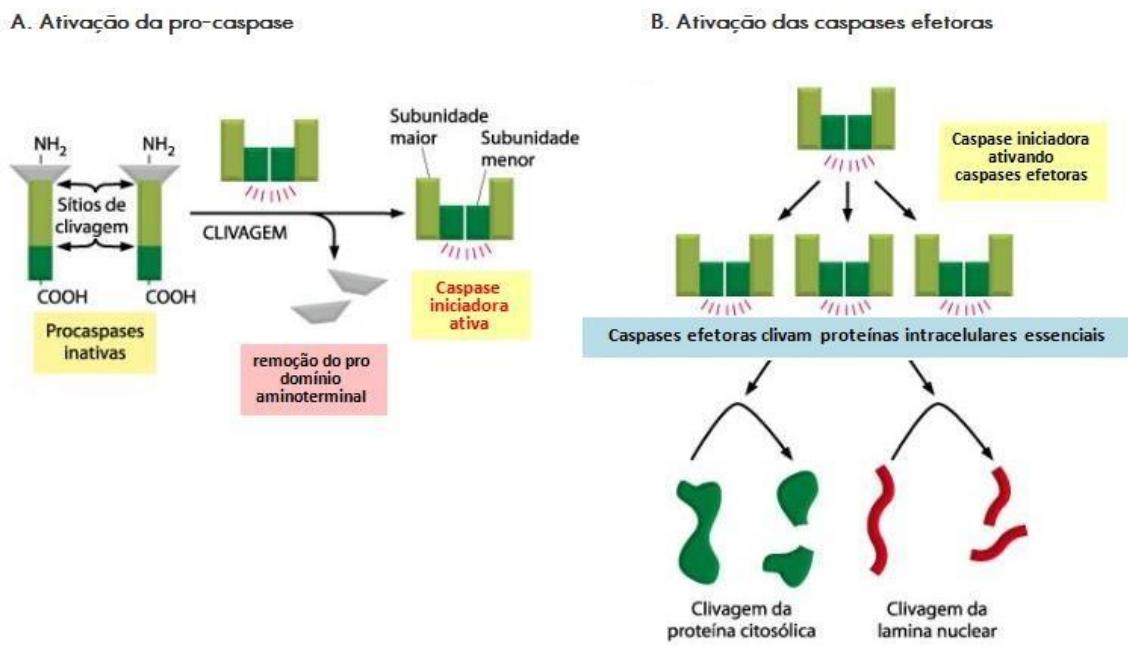
Quando ativadas, as caspases clivam e degradam proteínas essenciais para a funcionalidade celular, tais como proteínas estruturais do citoesqueleto, proteínas nucleares e enzimas de reparo do DNA. Também atuam ativando outras enzimas degradativas, como as DNases, que clivam o DNA nuclear, promovendo sua fragmentação. Podem ser classificadas em iniciadoras ou efetoras, de acordo com seu pró-domínio ou referente a seu papel na apoptose.

As caspases iniciadoras apresentam pró-domínios longos e, de acordo com sua denominação, compreendem o estágio inicial da cascata proteolítica. Atuam clivando pró-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as. Tem-se como exemplo a caspase-8 e a caspase-9, além das caspases-2 e 10.

As caspases efetoras são constituídas por pró-domínios curtos ou inexistentes e, por sua vez, clivam outras proteínas da célula que processam a apoptose (Fig. 1). As caspases iniciadoras requerem o auxílio de proteínas adaptadoras, que se ligam às regiões de interação proteica, localizadas ao nível dos pró-domínios. A ligação do adaptador resultará em ativação das caspases iniciadoras, para que estas possam, enfim, clivar e ativar as caspases efetoras. Com isto, as moléculas adaptadoras atuam como um conector entre os eventos de sinalização e a ativação das caspases. Exemplos são as caspases efetoras 3, 6 e 7. Uma vez ativada, a caspase efetora cliva a proteína ICAD (*inhibitor of caspaseactivated DNase*), que normalmente encontra-se ligada a uma DNase (CAD) no citoplasma. A CAD torna-se ativa e penetra no núcleo, promovendo a clivagem entre os nucleossomos. A fragmentação do DNA nesses pontos específicos resulta no processo de morte celular programada (RUPNARAIN et al, 2004)

Dentre os substratos das caspases, tem-se a proteína mdm-2 (murine double minute). Esta proteína liga-se à p53, uma proteína indutora de apoptose, fazendo com que

permaneça no citoplasma. Ao sofrer clivagem pelas proteases, a p53 se transloca para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos como o Bax (SCHULER et al., 2003).



(Adaptado de Alberts et al., 2006)

Figura 1 – Ativação das Caspases. As caspases encontram-se no citoplasma celular sob a forma inativa. Durante a ativação, ocorre a remoção do pró-domínio aminoterminal e a clivagem do polipeptídeo restante, resultando em duas subunidades, sendo uma maior e outra menor, que constituirão a caspase iniciadora ativa. Esta, por sua vez, atua clivando e ativando outras caspases, denominadas caspases efetoras, que irão clivar e fragmentar substratos essenciais para a sobrevivência e estrutura celular.

2.3.1.1 Vias de ativação da apoptose

Há diversos fatores que podem induzir a morte celular por apoptose, tais como a exposição à radiação ionizante, calor, diminuição de fatores de crescimento, escassez de nutrientes, altas concentrações de espécies reativas de oxigênio e pelo

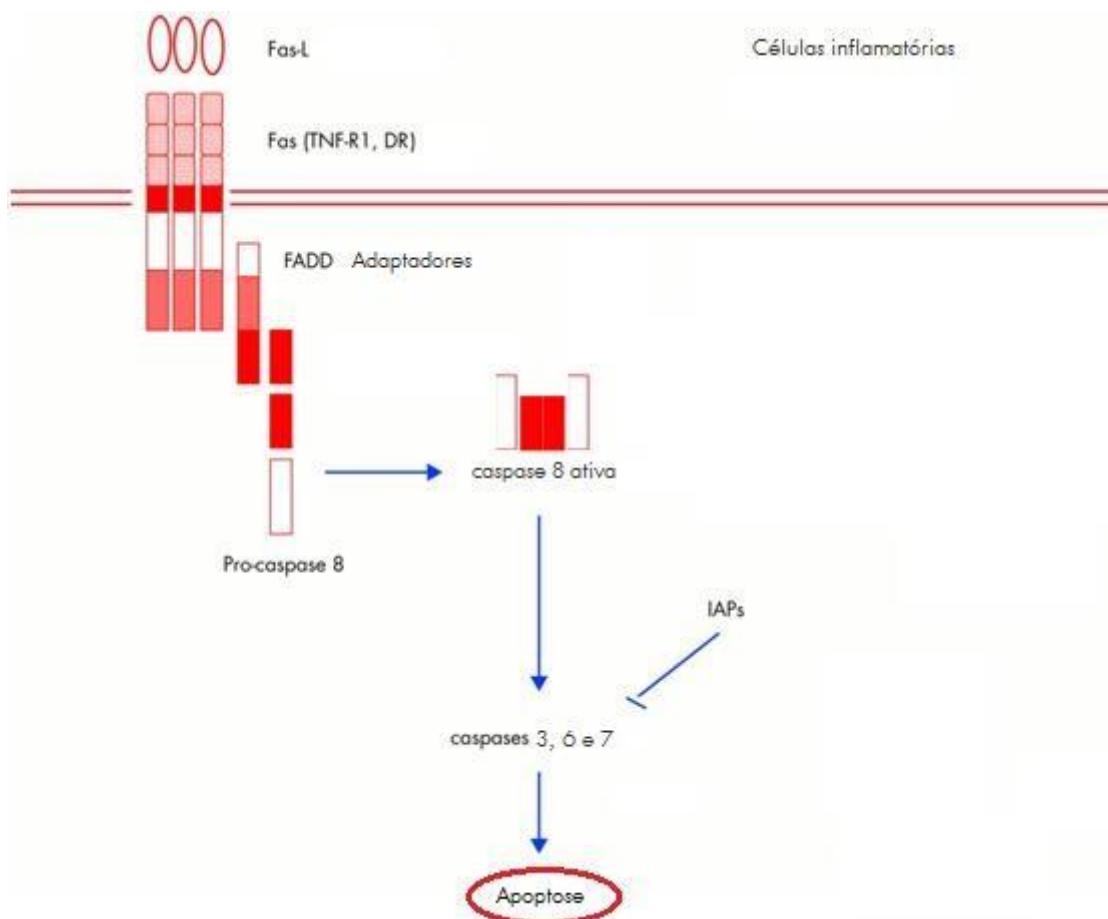
aumento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (HENGARTNER, 2000; DUFOURNET et al, 2006).

As caspases podem sofrer ativação por um de dois mecanismos, a saber - ou por ativação de receptores de morte celular, ou devido a uma disfunção mitocondrial (GRIVICICH et al, 2007).

Ativação das caspases por atuação em receptores de morte celular

Também chamada de via extrínseca ou citoplasmática, é utilizada para indicar casos de morte celular por apoptose, em que os estímulos são oriundos de sinais de estresse extracelulares, que são sentidos e propagados por receptores transmembranares específicos (TNF) (GALLUZZI et al., 2012).

Os receptores de morte pertencem à família de receptores de necrose tumoral (TNF-R), tais como o Fas (CD95), TNF-R1, ou receptores de morte (DR). Recebem esta denominação em decorrência de uma sequência de 65 aminoácidos, denominada “domínio de morte” (*death domain*) (NAISMITH, SPRANG, 1998). A via extrínseca é ativada por meio da ligação específica de ligantes aos receptores de morte, causando uma agregação trimerizada e consequente ativação dos receptores de morte específicos (ASHKENAZI, DIXIT, 1998; CHINNAIYAN et al., 1995). Sua ativação leva à interação de seus domínios de morte com proteínas adaptadoras (FADD-Fas, TNF-R1-TRADD, etc.) (ASHKENAZI, DIXIT, 1998), que têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 para o complexo (COHEN, 1997). Dentro deste complexo de Faz, FADD e caspase-8, conhecido como “complexo de sinalização de indução de morte” (DISC), a caspase torna-se proteoliticamente ativa por oligomerização (MUZIO et al., 1996). Durante a ativação, há a remoção do pró – domínio aminoterminal e a clivagem do polipeptídeo restante, resultando em duas subunidades, sendo uma maior e outra menor, que constituirão a enzima funcional (Fig. 2). Esta, por sua vez, irá ativar as caspases efetoras, incluindo as caspases-3, 6 e 7, que atuam como efetoras à jusante do programa de morte celular (ASHKENAZI, DIXIT, 1998; MARTIN, 2002).



(Adaptado de MARTIN, 2002)

Figura 2 – Esquematização de morte celular pela via de sinalização Fas. O receptor Fas, protótipo da superfamília dos receptores de morte dos fatores de necrose tumoral (TNF), liga-se a seu ligante (Fas-L). O recrutamento da molécula adaptadora FADD e pro-caspase-8 resulta na ativação deste último. A caspase-8 ativa leva à ativação direta de caspases efetoras (3, 6 e 7), resultando em fragmentação do DNA e clivagem de proteínas celulares. Esta via não envolve vias mitocondriais. A ativação da caspase-8 resulta, também, em clivagem de Bid, que transloca e interage com outros membros da família Bcl-2.

IAPs: proteínas inibidoras de apoptose.

FADD: Domínio de Morte FAS-associada

FAS/CD95: receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose

TNFR: receptor do fator de necrose tumoral

Ativação das caspases por perturbação mitocondrial

Também conhecida como apoptose por via intrínseca, pode ser desencadeada por uma infinidade de estímulos de estresse intracelular, tais como lesão no DNA,

estresse oxidativo, acúmulo de proteínas desordenadas no retículo endoplasmático, ausência de fatores de crescimento celular, hipóxia, entre outros. Apesar de envolver uma cascata de sinalização e estímulos iniciadores altamente heterogêneos, os mecanismos apresentam em comum o envolvimento da mitocôndria (GALLUZZI et al., 2012). As mitocôndrias contêm em seu espaço intermembranar fatores apoptogênicos, como citocromo C, AIF (fator indutor de apoptose), pró - caspases 2, 3 e 9, SMAC/DIABLO (*Second Mitochondria-Derived A activator of Caspases/direct IAP binding protein with low pI*), Omi/HtrA2 (*High temperature requirement protein-2*) e endonuclease G (CLARKE et al., 1999). Desta forma, os sinais que são transmitidos em resposta aos estímulos de estresse irão convergir principalmente para a mitocôndria, que ao integrar os estímulos de morte celular, induzirá a sua permeabilização, liberando as moléculas de proteínas próapoptóticas nela contidas (GRIVICICH, 2007). Esta permeabilização da membrana externa da mitocôndria ocorre através da formação de canais que promovem a liberação de diversas substâncias para o citosol, dentre as quais se encontra o citocromo C.

Uma vez que o citocromo C é liberado no citosol irá atuar como um co-fator ao interagir sua região C-terminal com a proteína adaptadora Apaf-1 (Protease Apoptótica Ativadora de Fator 1). Esta interação facilita a ligação ao dATP e prócaspase-9, levando à formação de um complexo denominado apoptossomo e à ativação da caspase-9, a qual ativará outras caspases, como as pró-caspases 3 e 7, resultando na apoptose pela via mitocondrial. As proteínas Smac/Diablo e Omi/HtrA2 auxiliam na ativação das caspases a partir do sequestro ou degradação de proteínas da família IAPs (*inhibitor of apoptosis protein*) (GALLUZZI et al., 2012) (Fig. 3).

Associado ao mecanismo envolvido na liberação de fatores apoptogênicos, alterações do potencial de membrana da mitocôndria, bem como da permeabilidade mitocondrial levam ao colapso dessa membrana. Com isto, a síntese de ATP é interrompida resultando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (GALLUZZI et al., 2012).

2.3.1.2 Proteínas da família Bcl-2

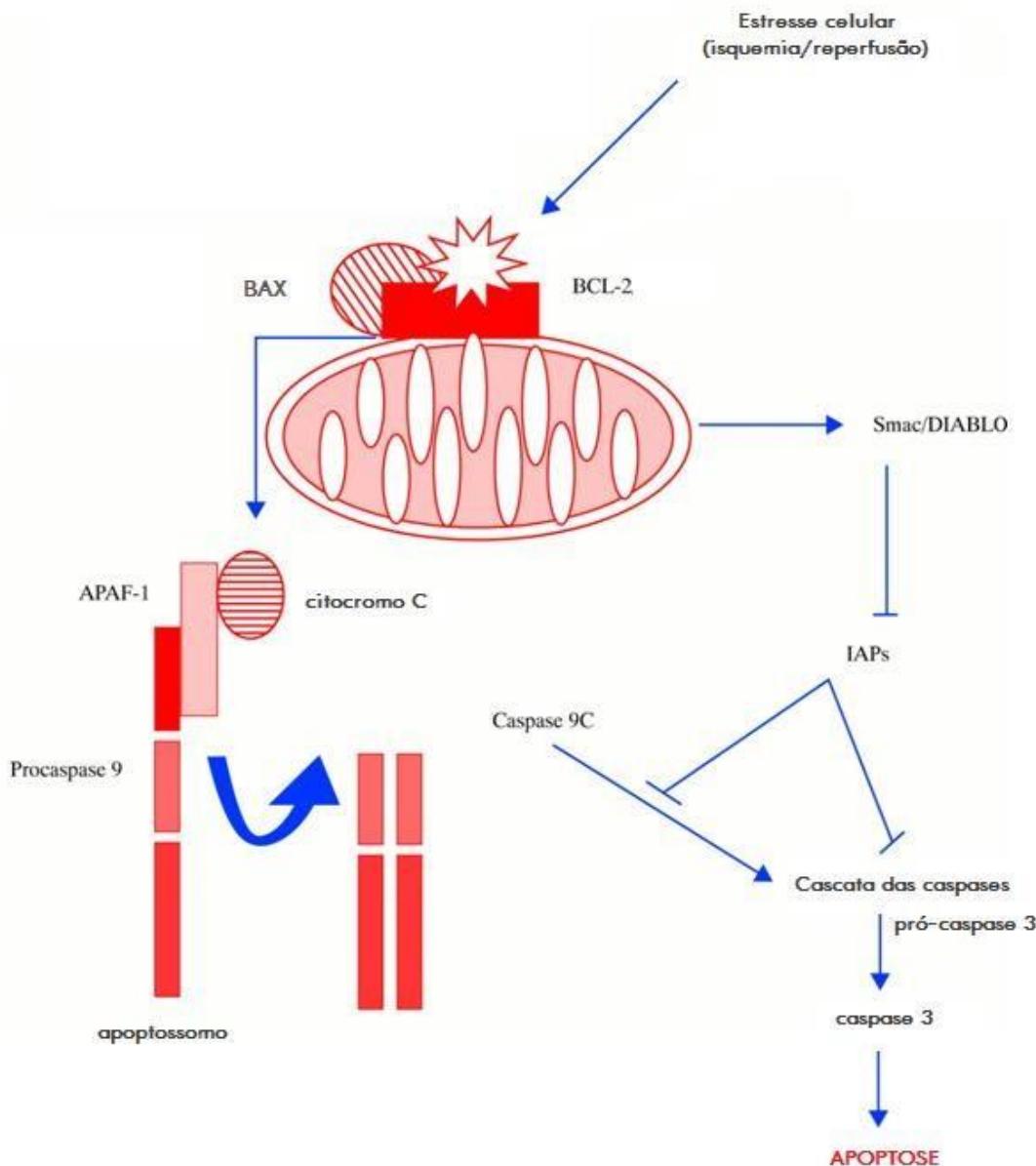
Os membros da família Bcl-2 são importantes reguladores da apoptose. As proteínas desta família podem atuar como indutoras ou repressoras da morte celular por apoptose, contribuindo para surgimento de patologias, ou protegendo o coração de diversas doenças, respectivamente.

O Bcl-2 foi o primeiro gene a ser identificado em uma família de moléculas que possui uma homologia de sequência e atividade pró-apoptótica ou antiapoptótica (KRAJEWSKI, 1993). A expressão de Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, ao prevenir a liberação de citocromo c, sendo então chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bax (*B cell lymphoma 2- associated protein X*) e Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) são proteínas pró-apoptóticas, já que sensibilizam ou conduzem a célula à apoptose (GRIVICICH, 2007). Além disto, a Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) impede a formação de espécies reativas de oxigênio e a acidificação celular, e atua estabilizando o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER HEIDEN, THOMPSON, 1999).

As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar um equilíbrio entre elas, mantendo a homeostasia a partir do controle entre a quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos de morte resultam em desequilíbrio da expressão dessas proteínas, onde um aumento das pró-apoptóticas induz a apoptose. Tais proteínas também são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre os dímeros regula, reciprocamente, as suas funções (PETROS et al., 2004).

A atividade anti-apoptótica da Bcl-2 pode ser atribuída a diferentes mecanismos. Pode ocorrer devido à inibição da ação do citocromo C na mitocôndria, evitando a cascata de eventos. A Bcl-2 impede a permeabilização da membrana externa da mitocôndria através do sequestro de Bax ou pelo antagonismo de sítios de Bax na membrana externa mitocondrial (MURPHY et al., 2000). A interação da Bcl-2 com as AIFs culmina em inibição da cascata das caspases e consequente bloqueio da apoptose. Por sua vez, a Bax pode ativar a apoptose de forma independente da interação com proteínas anti-apoptóticas, através de sua ligação com a mitocôndria (PETROS et al., 2004).

A partir de um estímulo específico externo, um aumento da concentração de Bax, comparado à de Bcl-2, leva a formação de homodímeros, e as células ficam suscetíveis a apoptose. Com os níveis de Bcl-2 acima da concentração de Bax, ocorre a formação de heterodímeros Bax-Bcl-2 e as células ficam protegidas, retardando a morte celular por apoptose (OLTVAI et al, 1993). Para avaliar a possível ação da laserterapia nos fatores anti- apoptóticos e pró-apoptóticos, investigamos a expressão gênica e proteica de Bcl-2 e Bax.



(Adaptado de MARTIN, 2002)

Figura 3 - Esquema das vias de sinalização da apoptose por perturbação mitocondrial. Membros antiapoptóticos da família Bcl-2, tais como o Bcl-2, estão localizados na membrana mitocondrial externa e atuam impedindo a liberação de fatores apoptogênicos do espaço mitocondrial interno para o espaço externo. A Bax desencadeia a liberação de citocromo C e Smac / DIABLO. O citocromo C, em conjunto com a proteína adaptadora Apaf-1 e a caspase-9, forma o apoptossomo, com a caspase-9 ativa. Esta, por sua vez, ativa a caspase-3 e a cascata de caspase e a jusante. A Smac / DIABLO inibe IAP (inibidor de apoptose de proteínas), bloqueando sua ação de inibir a atividade de caspase, propagando assim a apoptose. Estímulos, como a retirada do fator de crescimento, ativação de p53 e ativação Faz ou isquemia/reperfusão em células tipo II agir por essa via mitocondrial.

2.4 Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos

A experimentação animal tem uma importância inestimável nas pesquisas científicas, contribuindo demasiadamente para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Ao longo do tempo, tais contribuições são transmitidas em aprimoramentos diagnósticos e inovações terapêuticas de inúmeras doenças que acometem os seres vivos. Apesar do avanço no desenvolvimento de novos métodos alternativos (estudos *in vitro*, cultura de células, etc.), a experimentação animal ainda é muito empregada por apresentar vantagens que os demais métodos não possuem como o fornecimento de informações do organismo em geral (HEYWOOD, 1987; RIBEIRO et al., 1995; SNITKOFF, 2004).

O método experimental de IAM por oclusão da artéria coronária esquerda em ratos foi inicialmente descrita por Heimburger em 1946. A técnica sofreu algumas alterações, sendo posteriormente descritos por Johns e Olson (1954), Kaufman et al. (1959) e Selye et al. (1960). Um dos modelos mais utilizados para o estudo das alterações fisiopatológicas decorrentes da oclusão coronariana é o modelo do infarto experimental no rato. Este método apresenta diversas vantagens, tais como a facilidade em realizar a cirurgia e o baixo custo na aquisição e manutenção dos animais (JOHNS, OLSON, 1954; FISHBEIN et al., 1978), que podem ser criados especificamente para os protocolos. Outra vantagem está presente na evolução do infarto que, devido às características metabólicas, ocorrem rapidamente e as etapas envolvidas neste processo (remodelamento, necrose, apoptose, etc.) podem ser observadas em menos tempo durante o estudo. E por fim, a similaridade com as alterações fisiopatológicas que ocorrem após o infarto com aquelas encontradas em humanos (FISHBEIN et al., 1978; KLOCKE et al., 2007)

Comumente, utilizam-se animais cujo peso varia entre 200 e 250 gramas por apresentarem taxa de mortalidade cirúrgica inferior aos animais mais velhos. O uso de animais do mesmo sexo está relacionado à variabilidade de adaptações cardíacas, em resposta a diversos estímulos (LITWIN et al., 1995; JAIN et al., 2002).

A mortalidade nas primeiras 24 horas após a oclusão coronariana normalmente varia entre 40 e 60%. A principal causa de óbito são as arritmias malignas prevalentes. Dentre as outras causas, destacam-se os fatores relacionados ao próprio procedimento cirúrgico, como pneumotórax e depressão respiratória e fatores associados à insuficiência cardíaca, como o edema agudo de pulmão (LITWIN et al., 1995; PFEFFER et al., 1979).

Outro fator determinante é o tamanho do infarto. Em estudo realizado por Pfeffer et al. 1985, acompanhando animais infartados por período de um ano,

verificaram que para infartos pequenos (5 a 19,9% do ventrículo esquerdo), moderados (20 a 39,9%) e grandes ($\geq 40\%$), as taxas de mortalidade ficaram ao redor de 50%, 75% e 85%, respectivamente.

Além disso, a variação no tamanho do IM, também pode ou não influenciar na evolução para a insuficiência cardíaca congestiva, dependendo da extensão da lesão miocárdica secundária à oclusão coronariana (GAUDRON et al., 1994; TUCCI, 2010).

O eletrocardiograma e o ecocardiograma são métodos não invasivos capazes de identificar a área de necrose ou cicatricial em coração de ratos submetidos à oclusão coronariana. O ecocardiograma apresenta alta sensibilidade na caracterização de presença e tamanho do IM, até mesmo em períodos precoces, como dois dias após promover a necrose, além de informar sobre a função ventricular (SANTOS et al., 2009).

2.5 Laser de Baixa Intensidade (LBI)

O LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é uma energia formada por fótons, onde a luz emitida pelos equipamentos laser apresenta características específicas dos fótons que a compõem.

A luz produzida pelo laser de baixa intensidade (LBI) se apresenta como uma radiação eletromagnética que possui características diferentes da luz comum. É constituída por um único comprimento de onda, direção e freqüência, além de uma alta concentração de energia, que se propaga no espaço e no tempo. Tais características conferem a esse tipo de luz as propriedades de monocromocidade, colimação e coerência (GOODMAN, KAUFMAN, 1977).

O LBI opera em potências na faixa dos miliwats (mW), o que faz com que a radiação emitida não seja térmica e, assim, seus efeitos biológicos não são perceptíveis, sendo decorrentes de efeitos foto-físicos, fotoquímicos e fotodinâmicos nas células dos tecidos irradiados. O tipo do tecido que irá receber a fonte de energia, bem como características relacionadas ao próprio laser, como comprimento de onda, energia aplicada e tempo de exposição irão determinar a extensão de absorção da radiação (KARU, 1989).

Recentemente, a laserterapia tem se tornado uma alternativa terapêutica, por modular vários processos biológicos, contribuindo com um efeito anti-inflamatório, com sua capacidade em reduzir a dor e acelerar a proliferação celular. Assim, ao atuar

em nível celular, pode provocar modificações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas, promovendo aumento do metabolismo, proliferação e maturação celular, quantidade de tecido de granulação e na diminuição dos mediadores inflamatórios, induzindo o processo de cicatrização (LOPES-MARTINS et al., 2006; ALBERTINI et al., 2007; AIMBIRE et al., 2008; ALBERTINI, et al., 2008; BORTONE et al., 2008; XAVIER et al., 2010; SILVA et al., 2011; PIRES et al, 2011; HUANG et al., 2011; MESQUITA-FERRARI et al., 2011; PEPLOW et al., 2012, SILVA et al., 2016).

A absorção molecular do laser causa um aumento do metabolismo celular, caracterizado pela estimulação de fotorreceptores na cadeia respiratória mitocondrial, alterações nos níveis de ATP celular, na liberação de fatores de crescimento e na síntese de colágeno (TUBY et al., 2006; HUANG et al., 2011; PEPLOW et al., 2012).

A modulação celular, ou seja, a ativação ou inibição de processos celulares de expressão gênica ou protéica, ainda é pouco estudada. Em trabalhos de nosso grupo (BORTONE et al., 2008 e SILVA et al., 2011) e em colaboração como outros grupos de pesquisa (ALBERTINI et al., 2007; AIMBIRE et al., 2008; ALBERTINI et al., 2008; XAVIER et al., 2010; PIRES et al., 2011; MESQUITA-FERRARI et al., 2011; SILVA et al., 2016) têm sido observada uma diminuição da expressão de mediadores inflamatórios pela ação da laserterapia, levando a uma redução do processo inflamatório.

Entretanto, a ação do laser no IM ainda está para ser esclarecida e pouco se sabe sobre o comportamento do miocárdio remanescente ao infarto frente a esta terapia. Oron et al. (2001) utilizando modelo experimental, analisaram os efeitos do laser de baixa energia (laser infravermelho, comprimento de onda 803nm) no miocárdio infartado e, verificaram significativa redução da dimensão do infarto e presença de tecido cicatricial típico no miocárdio infartado de cães, bem como uma diminuição no dano causado nas mitocôndrias de cardiomiócitos na zona isquêmica de corações de ratos submetidos ao infarto, sugerindo um efeito cardioprotetor atribuído ao laser. Todavia, os dados acerca das repercussões à área de infarto são incipientes, sendo necessários mais estudos sobre a influência da laserterapia de baixa intensidade sobre o infarto e o processo de remodelamento.

Independente da condição fisiopatológica, os benefícios da laserterapia abrangem a redução do processo inflamatório com redução de seus mediadores químicos. São demonstrados resultados de melhora da inflamação e edema de pata induzida por carragenina [redução de RNA mensageiro de Cox-2 (ALBERTINI et al., 2007); redução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (ALBERTINI et al.,

2008); menor expressão de receptores de cininas (BORTONE et al., 2008); diminuição da expressão gênica de calicreínas (SILVA et al., 2011)], da redução da inflamação de vias aéreas induzida por lipopolissacarídeo [diminuição da expressão de interleucinas (AIMBIRE et al., 2008)], na tendinite [diminuição da expressão de citocinas (XAVIER et al., 2010); diminuição da expressão gênica de citocinas próinflamatórias e aumento da expressão de citocina anti-inflamatória (PIRES et al, 2011)], na cicatrização (PEPLOW et al., 2012) e na reparação muscular [redução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (MESQUITA-FERRARI et al., 2011)] entre outros. Todavia, os dados acerca das repercussões desta terapia sobre o miocárdio e, sobretudo no miocárdio remanescente à área de infarto, são incipientes, sendo necessários mais estudos sobre a ação da laserterapia de baixa intensidade sobre o infarto e o processo de remodelamento.

O estudo do miocárdio remanescente ao infarto é importante para o entendimento dos processos de remodelamento e disfunção cardíaca. Assim como no homem, o remodelamento ocorrido no miocárdio remanescente ao IM em ratos implica em disfunção contrátil que consequentemente exacerba a disfunção ventricular e a IC, renovando o ciclo vicioso desta cardiopatia (FRANCIS et al., 2001).

Frente à hipótese de que a laserterapia poderia interferir positivamente sobre o processo de remodelamento deste tecido remanescente e, dessa maneira, contribuir com a preservação da função cardíaca, este trabalho consiste da análise dos efeitos da laserterapia sobre o IM em ratos, mais precisamente, sobre a sua ação na modulação do processo apoptótico. Desta forma, a aplicação de técnicas de biologia molecular, associada à utilização de modelos experimentais, poderá permitir que aspectos fundamentais da regulação dos diversos mecanismos envolvidos no IM possam ser bem compreendidos e utilizados para modular a expressão de genes com o intuito de melhorar a contratilidade cardíaca e interromper a progressão ou reverter o quadro do IM.

Através da compreensão e esclarecimento de vias bioquímicas, bem como da modulação gênica pertencentes a estas, novas abordagens terapêuticas podem ser estabelecidas. Assim, pretende-se avaliar em modelo de oclusão, as alterações no perfil de expressão de fatores de apoptose que ocorrem no miocárdio após tratamento com laser de baixa intensidade.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) após três dias de infarto do miocárdio em animais submetidos à oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda.

3.2 Objetivo Específico

Avaliar a expressão gênica dos fatores de apoptose Bcl-2 e Bax, assim como a expressão proteica da Caspase-3 clivada, envolvidos no Infarto do Miocárdio em animais submetidos à Oclusão da Artéria Coronária, após laserterapia de baixa intensidade.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 O Modelo Experimental

Para estudar a modulação dos fatores de apoptose no infarto do miocárdio (IM) pela laserterapia foi escolhido um modelo experimental de IM induzido por oclusão coronariana.

4.1.1 Preparo dos animais

Os procedimentos cirúrgicos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíacas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM).

As análises moleculares foram conduzidas no Laboratório de Pesquisa da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

Para o estudo, foram utilizados 15 ratos da linhagem Wistar, fêmeas, pesando entre 250 e 280 gramas, provenientes do Biotério Central da UNINOVE. Os animais foram confinados em caixas plásticas em ambiente com temperatura controlada (22º C) e ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com água e ração *ad libitum* (Nuvilab). O uso de ratas, ao invés de ratos, mostrou-se viável em experimento prévio, além de maior disponibilidade no biotério. Todo processo experimental foi conduzido em acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals

(NIH, Pub 85-23, revisado em 1985)”. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNINOVE (parecer 0015/2012).

4.2 Grupos Experimentais

Os animais (n=15) foram divididos em três grupos (n=5):

- ✓ **Grupo infarto (IM):** ratas que foram submetidos à oclusão da coronária sem irradiação laser, **n=5**;
- ✓ **Grupo infarto + laser irradiado (IM+Laser):** ratas que foram submetidos à oclusão coronária seguido da irradiação laser de baixa intensidade, **n=5**;

- ✓ **Grupo Sham (Controle):** ratas que foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem infarto e irradiação de laser de baixa intensidade, $n=5$.

No grupo de animais infartados, somente foram incluídos no estudo corações que apresentaram área de infarto igual ou superior a 40% do ventrículo esquerdo. A noção que o IM de grande dimensão está associado com severo remodelamento ventricular esquerdo e piora no prognóstico da doença (GABALLA et al., 2002; SANTOS et al., 2009) constitui a razão pela qual foram incluídos no estudo somente animais com $IM \geq 40\%$. Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de oclusão coronária que não apresentarem IM também foram excluídos da amostra.

4.3 Produção da Técnica de Oclusão Coronária

Os animais foram anestesiados com mistura intraperitoneal de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), entubados e ventilados com pressão positiva em ventilador para roedores (modelo Harvard 683). Após tricotomia do hemitórax esquerdo, foi realizada toracotomia lateral no local onde o coração causa impacto à palpação. Com o animal na posição supina, foi feita incisão da pele e divulsão dos músculos peitorais e intercostais, com auxílio de pinça Kelly curva. Após divulsão do músculo intercostal, as costelas foram afastadas com auxílio da pinça Kelly e de afastador Stevenson modificado. A pericardiotomia foi produzida por meio de pinça anatômica e a artéria coronária descendente anterior visualizada.

Para a produção do infarto do miocárdio por oclusão da artéria coronária foi ligada a, aproximadamente, três milímetros de sua origem na aorta, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar, por meio de fio de sutura nylon 5,0 (Fig. 4). Após serem checados os resultados da sutura, o afastador foi retirado, para a promoção da hiperinsuflação pulmonar, e a seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica e o tórax foi fechado por sutura em bolsa previamente preparada em torno das bordas da incisão. Em seguida, o animal foi mantido em ventilação artificial enriquecida com oxigênio até que ocorressem movimentos ventilatórios espontâneos. Os animais foram colocados em caixas e mantidos aquecidos durante o período pós-operatório, até que se recuperassem completamente da anestesia. O grupo controle foi composto por animais submetidos à cirurgia fictícia da oclusão coronariana, sendo denominado grupo *Sham*.



Figura 4 – Indução do infarto experimental. Exteriorização do coração para sutura coronária a 3 mm da origem, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar.

4.4 Irradiação do Laser

O laser de baixa intensidade de Alumínio Gálio Índio Fósforo – AlGaInP - com comprimento de onda de 660 nm, 15mW de potência, densidade de energia 22,5 $\frac{2}{J/cm^2}$, 60 segundos de aplicação, área irradiada 0,785 cm^2 , dose 1,1 J/cm^2 (Twin Laser – M M Optics®) foi utilizado no estudo. Esta dose foi usada previamente por ORON et al. (2001) e em estudo piloto. Após a oclusão, como descrito acima, o coração foi reposicionado na caixa torácica por 60 segundos para sua estabilização e após esse período, o coração foi exteriorizado para receber a irradiação laser com os parâmetros descritos acima.

A caneta laser foi posicionada em um dispositivo com aproximadamente 5 mm de distância da área do ventrículo esquerdo (Fig. 5). O grupo infarto (IM) foi submetido ao mesmo procedimento, porém o laser esteve desligado; e no grupo Sham não houve indução do infarto e nem irradiação do laser. Depois de realizado o procedimento, os ratos foram mantidos em ventilação artificial até a sua normalização.

O estudo ecocardiográfico transtorácico (ECO) foi realizado para estimativa do tamanho do infarto do miocárdio, morfologia cardíaca e função ventricular. Todos os animais foram submetidos ao ecocardiograma no 3º dia após a oclusão da artéria coronária (OAC). O exame foi realizado segundo técnica já consolidada em nosso laboratório (NANNI et al., 2006; MOISÉS et al., 2000; BONILHA et al., 2005), com aparelho SONOS 5500®, que permite obtenção de imagens cardíacas em tempo real nos modos mono e bidimensional.

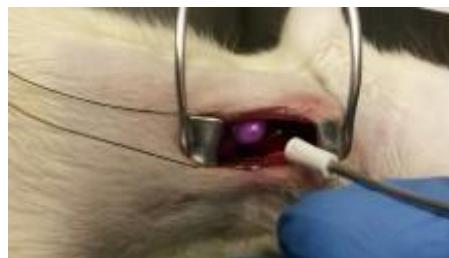


Figura 5 – Irradiação do laser. Dispositivo a uma distância aproximada de 5 mm do ventrículo esquerdo.

4.5 Análise da Expressão Gênica

4.5.1 Coleta de material biológico – Tecido

Os animais foram mortos por decapitação. Tal método de eutanásia se faz necessário em função da ação de anestésicos nas análises bioquímicas. Imediatamente após a excisão do coração e determinação da massa miocárdica, o miocárdio remoto ao infarto foi lavado em solução fisiológica para remoção do excesso de sangue. Em seguida, as amostras de tecido foram colocadas em tubos de 1,5 mL para congelamento em nitrogênio líquido. O material biológico foi armazenado em temperatura de -80°C até a data de processamento para avaliação da expressão gênica.

4.5.2 Procedimentos – PCR

Os RNAs mensageiros de Bax e Bcl-2 foram quantificados por PCR – Real Time (Sybr Green – Life Technologies).

- **Extração de RNA**

Amostras do miocárdio ventricular esquerdo remoto ao IM, pesando entre 0,2[®] e 0,5 g, foram homogeneizadas em Trizol Reagent para extração do RNA total conforme instruções do fabricante. Em seguida, 200 ul de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e a mistura foi

agitada vigorosamente por 15 seg. Em seguida, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5min. As amostras foram centrifugadas por 15min, 12000xg a 4°C. A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5ml estéril, e foram adicionados 500 ul de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10min, e foram novamente centrifugadas (12000xg/4°C/10 min). Os sobrenadantes foram retirados, e os *pellets* de RNA foram lavados com 1ml de etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (12000xg/4°C/10 min), e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* secaram ao ar livre, sendo então ressuspensos com 50 ul de água DEPC, e armazenado a -80 ° C até a realização da Transcrição Reversa.

▪ **Tratamento do RNA total e Integridade das amostras**

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho NanoDrop ND-2000 espectrofotômetro (Nano Drop Products, Wilmington, DE, USA) sendo que 1U A260 corresponde a 40ug de RNA/mL. Foram utilizadas apenas amostras livre de contaminantes (A260/A230 ~1,8) e de proteínas (A260/A280 = 1,8-2,0).

A integridade do RNA total foi avaliada pela observação da proporção das bandas referentes aos rRNA 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Life Technologies). Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1ug de RNA total (8ul) foi incubado com 1 unidade (1 ul) de *DNAse I/RNase Free* – (*Invitrogen*, EUA), na presença 1 ul de solução contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM MgCl₂ por 15 min a 37 °C, seguido de incubação a 65°C durante 10 minutos para inativação da *DNAse I*.

▪ **Síntese de cDNA - Transcrição Reversa**

Logo após o tratamento acima descrito, foi realizada a reação de transcrição reversa (RTqPCR), para síntese do cDNA. Em 1ug de RNA total tratado foram adicionados 2ul de tampão de incubação (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4, 20 mM e MgCl₂ 2,5 mM), 1 unidade de transcriptase reversa (1ul) (*Invitrogen*), 2ul de Randon Primer (*Invitrogen*) 0,8 ul de oligonucleotideos (DNTPs, 100 mM) e 4,2 ul de H₂O ultra pura para uma reação final de 20 ul. As amostras foram então submetidas às seguintes

incubações: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min. Após a reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20°C para futura realização da PCR em tempo Real.

▪ **Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real - qPCR**

A reação de polimerização em cadeia em tempo real (Real-Time PCR) combina a amplificação do PCR com detecção fluorescente automatizada é realizada com o auxílio do aparelho de detecção da seqüência. A amplificação e aquisição dos dados foram realizadas com a sonda Taqman em equipamento Abi Prism 7500 Fast (Applied Biosystems) como descrito previamente (NANNI et al, 2006). Neste processo de excitação a captação de fluorescência é realizada em cada ciclo de amplificação do PCR, fornecendo uma quantificação em tempo real das seqüências dos genes de interesse. O protocolo utilizado para a reação de PCR em tempo real foi o seguinte: em 1,0 µl de cDNA, foram adicionados 5 µl de Solução Taqman Universal Fast Master Mix 2X (Applied Biosystems, EUA) e água suficiente para 10 µl de reação em cada poço da placa com 96 poços. As amostras foram aplicadas em duplicata e então incubadas a 95°C por 20s, e passaram por 40 ciclos térmicos a 95°C por 3s, 60°C por 30s.

Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção.

A concentração do gene alvo foi quantificada como um valor relativo em comparação com uma referência interna, o GAPDH, cuja expressão não varia no tecido sob investigação, ou em resposta ao tratamento experimental. O “software” SDS 1.4 Software for the 7500 Fast System (Applied Biosystems) foi utilizado para o processamento dos dados.

Os primers utilizados para o PCR em tempo real estão discriminados na tabela 2.

Tabela 2 – Sequências de primers dos genes estudados

Gene	Seqüência Forward e Reverse	Acesso no Gene Bank
Bax alvo	F: 5' ACTCCCCCGAGGTCTT-3' R: 5' AGTTGAAGTTGCCATCAGCAAA-3'	NM_ 017059.2
Bcl-2 alvo	F: 5' GCTACGAGTGGGATACTGG-3' R: 5' GTGTGCAGATGCCGGTTCA-3'	NM_ 016993.1
GAPDH	F: 5' TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' R: 5' GCCCACGGCCATCA-3'	NM_ 017008

4.6 Ensaio para expressão de proteínas Bax e Bcl-2

Ventrículos esquerdos congelados foram homogeneizados em tampão de lise celular (100 mM Tris, 50 mM de NaCl, 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 1% de Triton X-100), com inibidor de protease (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, EUA). As amostras contendo 30 µg do homogenato foram sujeitos a electroforese em gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida (SDS-PAGE) em géis de poliacrilamida a 10%. As proteínas separadas foram transferidas em membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) com tampão de transferência (192 mM glicina, 25 mM Tris, metanol 20%, pH 8,3). As membranas foram embebidas numa solução tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 5%, 10mM Tris-HCl, pH 7,6, NaCl 150mM e 0,1% de Tween 20) e incubadas durante a noite a 4 °C com os adequados anticorpos primários (diluição 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Após incubação durante a noite, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário Ig de cabra conjugada com peroxidase anti-rato (diluição 1:4000; Zymed, San Francisco, CA, USA). A visualização das bandas de proteína foi realizada utilizando substrato de quimioluminescência Super Signal Ultra (Pierce).

A análise densitométrica foi realizada através do software Image J.

4.7 Análise Estatística

Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. A comparação dos resultados entre os diferentes grupos para cada período de tempo pós-IM foi realizada com ANOVA uma via complementada pelo teste de NewmanKeuls. Todas as avaliações foram realizadas com o software estatístico

GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA, EUA). Um valor de $p \leq 0,05$ foi adotado como nível de significância.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análise de Expressão Gênica

Após a extração de RNA a partir de amostras de tecido cardíaco, estes foram quantificados por espectrofotometria (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantificação de RNA extraído das amostras de tecidos cardíacos dos animais submetidos à OAC após 3 dias.

Grupo	Amostra	Concentração ng/ul	Pureza 260/280 nm
SHAM	1	896,90	2,01
	2	898,80	1,98
	3	1067,20	1,94
	4	1246,80	2,04
	5	794,10	1,92
IM	6	1352,50	1,96
	7	1643,60	2,04
	8	847,60	1,95
	9	1525,90	2,02
	10	1936,00	1,98
IM+Laser	11	810,60	1,91
	12	749,00	1,87
	13	840,80	1,94
	14	1296,70	2,01
	15	1514,20	2,03

Para elucidar o padrão de expressão de RNA mensageiros de membros da família Bcl-2 de proteínas, sendo um anti-apoptótico (Bcl-2) e um apoptótico (Bax), utilizou-se a técnica de PCR em tempo real.

Nossos dados demonstram que expressão do mRNA de Bax não apresentou diferenças significativas no grupo irradiado (IM + Laser) quando comparado ao grupos infartado (IM) e controle. Entretanto, verificamos um aumento da expressão do gene Bcl-2 no miocárdio irradiado (IM + Laser), quando comparado com o grupo IM ($p \leq 0,05$). Os resultados estão apresentados na Figura 6A e B.

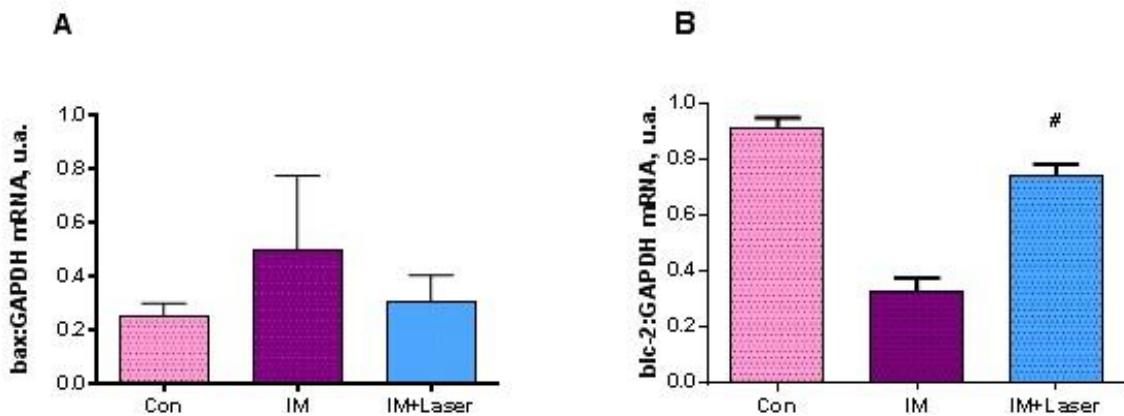


Figura 6 - Expressão de mRNA de *Bax* e *Bcl-2* sobre o tecido do miocárdio após laserterapia por ensaio de PCR em Tempo Real. (A) Expressão do mRNA de *Bax*. (B) Expressão do mRNA de *Bcl-2*. Todos os dados representam uma quantificação relativa para a expressão de GAPDH.

Os dados foram descritos em médias \pm E.P.M. * $p < 0,05$ versus grupo Controle, # $p < 0,05$ versus grupo IM. Os valores de P foram determinados por ANOVA.

5.2 Alterações na Expressão Proteica de *Bax* e de *Bcl-2* após Irradiação do LBI

Para avaliar se a laserterapia promoveu alteração na expressão das proteínas pró-apoptótica *Bax* e anti-apoptótica *Bcl-2*, a técnica de *Western blot* foi realizada. Em relação a proteína *Bax*, houve um considerável aumento em sua expressão no grupo IM em relação ao controle. Não verificamos modulação da expressão de *Bax* no grupo tratado (IM+Laser) em relação aos grupos controle e IM (Figura 7A e B). Nossos resultados evidenciam uma diminuição na expressão da proteína *Bcl-2* no grupo IM em relação ao grupo Controle e, um significativo aumento em sua expressão no grupo irradiado (IM+Laser) quando comparado ao grupo infartado (Figura 7C e D).

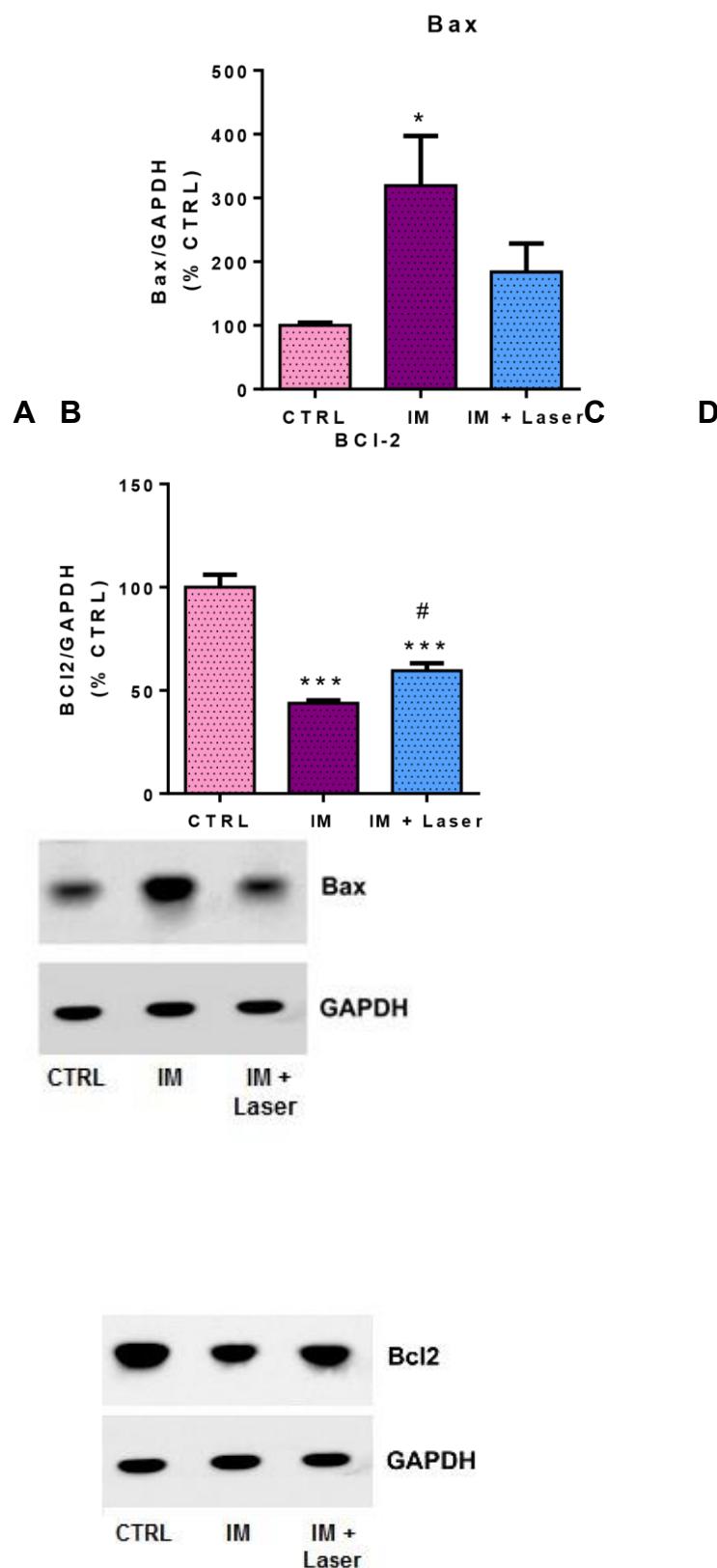


Figura 7 – Perfil de expressão proteica por immunoblotting das proteínas Bcl-2 e Bax, três dias após a cirurgia da oclusão da artéria coronária, após laserterapia. (A) e (B) Avaliação da expressão da proteína Bax. (C) e (D) Expressão proteica de Bcl-2. GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle.

Os dados foram descritos em médias \pm E.P.M. $\#p < 0,05$ versus grupo IM. *** $p < 0,05$ versus grupo Controle. Os valores de P foram determinados por ANOVA.

5.3 Mudanças na Expressão Proteica da Caspase-3 clivada

A técnica de *Western blot* foi utilizada para avaliar se houve alteração na expressão de caspase 3 clivada após a irradiação da LBI. Os resultados sugerem uma significativa diminuição na expressão da proteína caspase 3 clivada no grupo IM + Laser, quando comparada ao grupo IM, conforme observado na Figura 8.

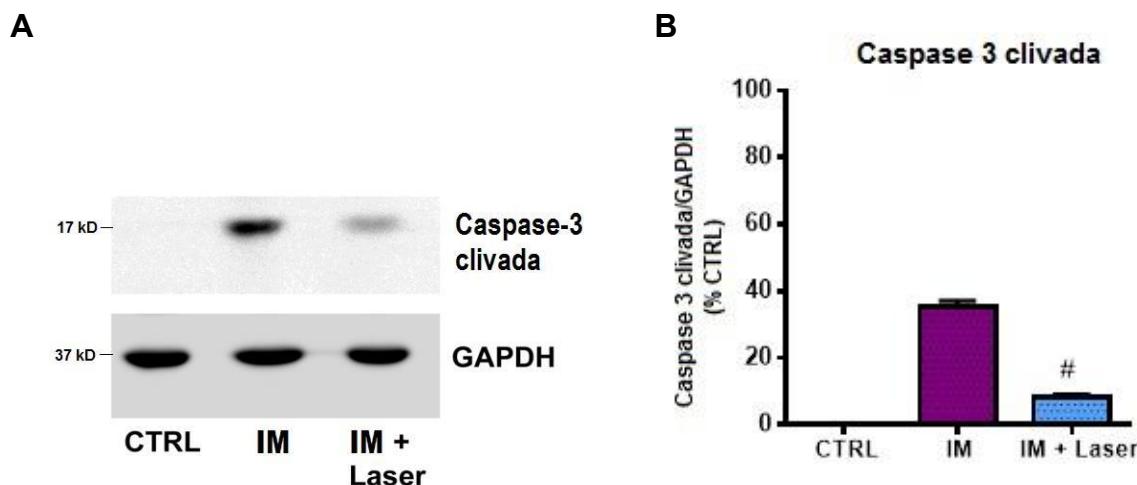


Figura 8 – Perfil de expressão da proteína Caspase-3 clivada, três dias após a cirurgia da oclusão da artéria coronária, após laserterapia. GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle. Os dados foram descritos em médias \pm E.P.M.

$\#p < 0,05$ versus grupo IM. Os valores de P foram determinados por ANOVA.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem a influência do laser de baixa intensidade (LBI) na modulação de fatores apoptóticos gerados pela oclusão coronariana e consequente morte celular. Na área da Saúde, a laserterapia teve seu crescimento a partir da década de 60 (BAXTER, 1997), onde foi utilizada principalmente para tratar lesões e promover alívio da dor. Seus efeitos no IAM começaram a ser elucidados por pesquisadores a partir de 2001, em estudo que mostrou que a laserterapia foi capaz de reduzir o tamanho do infarto (ORON et al. 2001). A dose do laser utilizada foi de 1,1 Joules e as avaliações ocorreram três dias após o IAM de acordo com ORON et al. (2001) e TUBY H & ORON (2006). Entretanto, nosso estudo inova ao usar para a análise molecular apenas animais com área de infarto igual ou superior a 40% do ventrículo esquerdo. Em humanos, infartos de grande extensão, maiores de 40% do VE, remetem ao fato da maior probabilidade de ocorrência de um relevante deficit funcional (FRANCIS et al., 2001; PFEFFER et al., 1979).

A ação anti-apoptótica de Bcl-2 já é bem documentada (OLTVAI et al., 1993; AKAO, 1994; MISAO, 1996; KROEMER, 1998; MAULIK et al., 1999). Em nosso estudo, a expressão de Bcl-2 três dias após a oclusão da artéria coronária apresentou uma diminuição da expressão de Bcl-2 no grupo infartado, quando comparado ao grupo controle. Em estudo realizado por Condorelli et al. (1999), em ratos submetidos a sobrecarga de pressão induzida, observou-se a diminuição da expressão RNA mensageiro de Bcl-2. A expressão de Bcl-2 é reportada à proteção celular por evitar a translocação e ativação de Bax (FINUCANE, et al., 1999). A proteína Bcl-2 já é expressa inicialmente ao infarto, onde Misao et al. (1996) detectaram sua presença cerca de seis horas após o infarto agudo, porém, não detectaram sua expressão em estágios mais crônicos, como na IC e hipertrofia cardíaca. O perfil de expressão proteica de Bcl-2 apresentou um aumento significativo após a laserterapia comparado ao grupo IM. Desta forma, evidenciamos que o tratamento com laserterapia aumentou de forma significativa a expressão gênica e proteica de Bcl-2 no grupo IM+Laser quando comparado com o grupo IM.

A proteína Bax está presente em diversos tecidos (KRAJEWSKI et al., 1994). De acordo com Misao et al. (1996), Bax mostra-se expresso mesmo em miócitos de corações humanos sem doença cardíaca. Nossos resultados corroboram os achados de Misao et al. (1996), mostrando uma expressão basal de Bax no grupo controle.

Entretanto, o aumento da expressão de Bax está associado com eventos pró-apoptóticos (WANG et al., 2014). Estudo utilizando células derivadas de ratos knockout para Bax e Bak, demonstrou que tais fatores são essenciais para a iniciação da morte das células através da via intrínseca (WEISLEDER et al., 2004). Observamos em nosso estudo um aumento significativo na expressão da proteína Bax no grupo infartado (IM), quando comparado ao grupo controle. Dados semelhantes foram relatados por outros autores (KAJSTURA et al., 1996; MISAO et al., 1996; MAULIK et al., 1999) que evidenciaram o aumento na expressão de Bax em miocárdios infartados. Entretanto, não observamos em nosso estudo diferença significativa na expressão tanto gênica como proteica de Bax após a laserterapia em relação aos demais grupos experimentais.

A caspase-3 clivada, proteína efetora que irá clivar substratos fundamentais para a sobrevivência celular, apresentou aumento de expressão proteica no grupo IM em relação ao grupo controle (BOATRIGHT & SALVESEN, 2003; RUPNARAIN et al, 2004). Entretanto, observamos uma significativa diminuição da expressão proteica da caspase-3 clivada no grupo IM+Laser em comparação ao grupo IM, sugerindo uma atenuação da apoptose promovida pela laserterapia.

Esses resultados sugerem uma modulação nos processos apoptóticos após a laserterapia, podendo, desta forma, estimular a sobrevivência celular após o infarto, inibindo a apoptose da área viável do coração possivelmente para manter a homeostase cardíaca após a lesão.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados suportam a hipótese de que o laser de baixa intensidade pode estimular a sobrevivência celular após o infarto, possivelmente por modular fatores envolvidos na apoptose da área viável do coração para manter a homeostase cardíaca após a lesão. A laserterapia de baixa intensidade se apresenta como uma nova estratégia terapêutica não farmacológica em modelo de oclusão coronária, havendo a necessidade de mais estudos para a maior elucidação de seus efeitos, bem como da dose e comprimento de onda a ser utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AD N, ORON U. Impacto f low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2001; 80: 109-16.

AIMBIRE F, ALBERTINI R, CORREA JC, SILVA JA JR, COSTA MS. Low Level Laser Therapy (LLLT) Decreases Pulmonary Microvascular Leakage, Neutrophil Influx and IL-1beta Levels in Airway and Lung from Rat Subjected to LPS-Induced Inflammation. *Inflammation*. 2008; 31:189-197.

AKAO Y, OTSUKI Y, KATAOKA S, ITO Y, TSUJIMOTO Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1994; 54:2468–2471.

ALBERTINI R, AIMBIRE F, SILVA JA JR, COSTA MS. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflammation Research*.2007; 56: 228-229.

ALBERTINI R, AIMBIRE F, VILLAVERDE, SILVA JA JR, COSTA MS. Cytokine mRNA Expression Is Decreased in the Subplantar Muscle of Rat Paw Subjected to Carrageenan-Induced Inflammation after Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine & Laser Surgery*. 2008; 26:19-24.

ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K *et al.* Fundamentos da Biologia Celular: uma Introdução à Biologia Molecular da Célula. 2^a ed. Porto Alegre: *Artmed*, 2006. 740 p.

ANVERSA P, CHENG W, LIU Y, LERI A, REDAELLI G, ANDKAJSTURA J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* **93**, Suppl 3: 8–12, 1998.

ASHKENAZI A, DIXIT V. Death receptors: signalling and modulation. *Science* 1998; 281:1305–8.

BALDI A, ABBATE A, BUSSANI R, PATTI G, MELFI R, ANGELINI A, *et al.* Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(2):165-74.

BASFORD JR. Low-energy Laser Therapy: controversies and new research findings. *Laser in Surgery and Medicine*, v.9, p.1-5, 1989.

BARDALES RH, HAILEY LS, XIE SS, SCHAEFER RF, and HSU SM. In situ apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* 149, 821-9, 1996.

BAXTER GF AND YELLON DM. Current trends and controversies in ischemiareperfusion research. *Basic Res Cardiol* 98: 133–136, 2003.

BOATRIGHT KM, SALVESEN GS. Mechanisms of caspase eactivation. *CurrOpin Cell Biol.* 2003;15:725-31.

BONILHA AMM, SARAIVA RM, KANASHIRO RM, PORTES LA, ANTONIO EL, TUCCI PJF. A routine electrocardiogram cannot be used to determine the size of myocardial infarction in the rat. *Braz J MedBiol Res.* 2005; 38:615-9.

BORTONE F, DOS SANTOS HA , ALBERTINI R, PESQUERO JB, COSTA MS, SILVA JA JR. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *International Immunopharmacology*. 2008; 8:206-210.

BRASIL. Ministério da Saúde. DataSUS. Indicadores de mortalidade [online]. Brasília; 2011. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm#mort>.

BUJA LM AND ENTMAN ML. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation* 98: 1355–1357, 1998.

CAFFORIO P, ROMITO A, GRIZZUTI MA, SILVESTRIS F. Metodiche di valutazione della morte cellulare programmata. *Recenti Progressi in Medicina*, v. 87, n. 7-8, p. 366- 373, 1996.

CHAGAS LR, SILVA JA JR, DE ALMEIDA PIRES J, COSTA MS. Expression of mPGES-1 and IP mRNA is reduced by LLLT in both subplantar and brain tissues in the

model of peripheral inflammation induced by carrageenan. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(1):83-8.

CHAVANTES MC. Princípios básicos do laser; laser no coração e pulmão. In: Chavantes MC, ed. *Laser em biomedicina*. São Paulo: Atheneu; 2008. cap. 1 e 10.

CHENG W, KAJSTURA J, NITAHARA JA, LI B, REISS K, LIU Y, CLARK WA, KRAJEWSKI S, REED JC, OLIVETTI G, ANVERSA P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res*. 1996; 226: 316-327.

CHINNAIYAN A, O'ROURKE K, TEWARI M, et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81:505.

CLARKE MJ, ZHU F, FRASCADR. Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals. *Chemical Reviews* 1999; 99, 2511-2534.

COHEN GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1–16.

COHN JN, FERRARI R, SHARPEN. Cardiac remodeling: concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling: behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(3):569-82.

CONDORELLI G, MORISCO C, STASSI G, NOTTE A, FARINA F, SGARAMELLA G, DE RIENZO A, RONCARATI R, TRIMARCO B, LEMBO G. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation*. 1999; 99:3071-3078.

DIEZ J, FORTUNO MA, RAVASSA S. Apoptosis in hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1998; 13(5):317-25.

- DUFOURNET C, UZAN C, FAUVET R, CORTEZ A, SIFFROI JP, DARAI E. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J Reprod Immunol.* 2006; 70:151-62.
- FINUCANE DM, BOSSY-WETZEL E, WATERHOUSE NJ, COTTER TG E VERDE DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem* 274: 2225–2233, 1999.
- FISHBEIN M, MACLEAN D, MAROKO P. Experimental myocardial infarction in the rat: Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol.* 1978; 90(1):57-70.
- FLISS H, GATTINGER D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996; 79:949–956.
- FRANCIS GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.* 2001; 110: 37S46S.
- FRANCIS J, WEISS RM, WEI SG, JOHNSON AK, FELDER RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281(5):R1734-45.
- GABALLA MA, GOLDMAN S. Ventricular remodeling in heart failure. *J Card Fail.* 2002; 8: S476-S85.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell and Differentiation.* v.10. p.107-120, 2012.
- GAUDRON P, K HU, et al. Effect of endurance training early or late after coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, hemodynamics, and survival in rats with chronic transmural myocardial infarction. *Circulation.* v.89, n.1, Jan, p.402-12. 1994.
- GOODMAN BD, KAUFMAN HW. Effects of an Argon Laser on the Crystalline Properties and Rate of Dissolution in Acid of Tooth Enamel in the Presence of Sodium Fluoride. *J. Dent. Res.*, v. 56, n. 10, p. 1201-1207, 1977.

- GOTTLIEB RA, BURLESON KO, KLONER RA, BABIOR BM, ENGLER RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* . 1994; 94:1621–1628.
- GRIVICICH, I *et al.* Revista Brasileira de Cancerologia. Morte Celular por Apoptose, Canoas, 2007. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf>. Acesso em: 17out. 2015.
- GRIVICICH I, REGNER A, ZANONI C, CORREA LP, JOTZ GP, HENRIQUES JA, *et al.* Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines. *Int j Colorectal Dis*. 2007; 22:1201-8.
- GUSTAFSSON AB, GOTTLIEB RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol*, January 1, 2007; 292(1): C45 - C51. .
- HANADA M, AIME-SEMPE C, SATO T, REED JC. Structure-function analysis of bcl2 protein: identification of conserved domains important for homodimerization with bcl-2 and heterodimerization with bax. *J Biol Chem*. 1995;270:11962-11969.
- HAUNSTETTER A, IZUMO S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 82: 1111–1129, 1998.
- HEGENBERGER CM, GHIRLANDA MR. Apoptosis: Revision de La Muerte Celular Programada y SUS Implicancias Clinicas. *Prensa Medica Argentina*, 84, p. 381388,1997.
- HEIMBURGER RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg*. 1946; 52: 677-89.
- HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-76.
- HEYWOOD R. The use of animals in testing. *Atla* 1987; 14(4): 329-33.

HOCKHAUSER E, KIVITY S, OFFEN D, MAULIK N, OTANI H, BARHUM Y, PANNET H, SHNEYVAYS V, SHAINBERG A, GOLDSHTAUB V, TOBAR A, VIDNE BA. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; Jun; 284(6):H2351-9.

HOCKMAN JS, BULKLEY BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation.* 1982; 65: 1446-50.

HUANG YY, SHARMA SK, CARROLL J, HAMBLIN MR. Biphasic dose response in low level light therapy -an update. *Dose Response.* 2011; 9 (4):602-18.

JAIN M, LIAO R, PODESSER BK, NGOY S, APSTEIN CS, EBERLI FR. Influence of gender on the response to hemodynamic overload after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H2544-50.

JOHNS TNP, OLSON BJ. Experimental myocardial infarction: I. Method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954; 140: 675-82.

KARU T, RYABYKH TP, FEDOSEYEVAS GE, PUCHKAVA NI. Helium-Neon laser induced respiratory burst of phagocyte cells. *Lasers Surg Med.* V..9, p.585-588, 1989).

KARU T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 49(1):1-17

KAJSTURA J, CHENG W, REISS K, CLARK WA, SONNENBLICK EH, KRAJEWSKI S, REED JC, OLIVETTI G, ANVERSA P. Apoptotic and necrotic myocytes cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86-107.

KAUFMAN N, GAVAN TL, HILL RW. Experimental myocardial infarction in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 1959; 67: 482-8.

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-range implications in tissues kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.

KLOCKE R, TIAN W, KUHLMANN MT, NIKOL S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*. 2007; 74: 29-38.

KRAJEWSKI S, TANAKA S, TAKAYAMA MJ, SCHIBLER W, FENTON W, REED JC. As investigações sobre a distribuição subcelular da proteína Bcl-2: residência no envelope nuclear, retículo endoplasmático e membrana mitocondrial externa. *Cancer Res* 1993; 53: 4701 □ 4714.

KROEMER G, DALLAPORTA B, RESCHE-RIGON M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 1998; **60**:619–642.

LERI A, LIU Y, MALHOTRA A, LI Q, STIEGLER P, CLAUDIO PP, GIORDANO A, KAJSTURA J, HINTZE TH, ANVERSA P. Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes.

Circulation. 1998; 97: 194 -203.

LERI A, CLAUDIO PP, LI Q, WANG X, REISS K, WANG S, MALHOTRA A, KAJSTURA J, ANVERSA P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest*. 1998; 101: 1326 -1342.

LEVY D, KENCHAIAH S, LARSON MG, BENJAMIN EJ, KUPKA MJ, HO KK, MURABITO JM, VASAN RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002, 347: 1397-1402.

LITWIN SE. The rat model of post infarction heart failure. *Heart Fail*. 1995; 11:182-95.

LOPES-MARTINS RA, MARCOS RL, LEONARDO PS, PRIANTI AC JR, MUSCARÁ MN, AIMBIRE F, FRIGO L, IVERSEN VV, BJORDAL JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol*. 2006; 101:283-8.

MAGALHÃES, FC *et al.* Hipertrofia cardiac induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v. 7, n. 1, p. 189-193, 2008.

MANCHINI, MT. Propriedades antiinflamatórias do laser de baixa intensidade após o infarto do miocárdio: participação dos peptídeos vasoativos e citocinas no remodelamento cardíaco. Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação, 2014.

MARTIN R BENNETT. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart*. 2002; 87:480487.

MATSUBARA BB, ZORNOFF LAM. Matriz colágena intersticial e sua relação com a expansão miocárdica no infarto agudo. *Arq Bras Cardiol*. 1995; 64: 559-63.

MAULIK N, GOSWAMI S, GALANG N, DAS DK. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF-kappaB on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Lett*. 1999; **443**:331–336.

MESQUITA-FERRARI, RA, MARTINS, MS; SILVA, TATIANA DIA; PIOVESAN, RF; JUNIOR JAS, PAVESI, VCS; BUSSADORI, SK, FERNANDES, KPS. Effects of lowlevel laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers in Medical Science*. 2011; 26:335-340.

MITTMANN C, ESCHENHAGEN T, SCHOLZ H. Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res*. 1998; 39(2):267-75.

MISAO J, HAYAKAWA Y, OHNO M, KATO S, FUJIWARA T, FUJIWARA H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*. 1996; 94(7):1506-12.

MOISÉS VA, FERREIRA RL, NOZAWA E, KANASHIRO RM, CAMPOS Fº O, ANDRADE JLD, CARVALHO ACC, TUCCI PJF. Structural and functional

characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography. *Arq Bras Cardiol.* 2000; 75:131-6.

MORGAN H, BAKER KM. Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation*, v. 83, p. 13-25, 1991.

MURPHY KM, RANGANATHAN V, FARNSWORTH ML, KAVALLARIS M, LOCK RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* 2000; 7:102-11.

MUZIO M, CHINNAIYAN A, KISCHKEL F, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ice/ced-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85:817-27.

MIYASHITA T, KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, WANG HG, LIN HK, LIEBERMANN DA, HOFFMAN B, REED JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994; 9:1799-1805.

NAISMITH JH, SPRANG SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23:74-79.

NANNI L, ROMUALDI C, MASERI A, LANFRANCHI G. Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 41:934-48.

NARULA J, HAIDER N, VIRMANI R, DISALVO TG, KOLODGIE FD, HAJJAR RJ, SCHMIDT U, SEMIGRAN MJ, DEC GW, KHAW BA. Apoptosis in myocytes in endstage heart failure. *N Engl J Med.* 1996; 335:1182-1189.

NICHOLSON DW, THORNBERRY NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22:299-306.

OLIVEIRA, IFB, FRANCISCHETTI I. Remodelação miocárdica e mecanismos de falência do coração nas sobrecargas pressóricas. *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica* (Cessou em 2003. Cont. ISSN 1679-1010 *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*), v. 32, p. 68-78, 2006.

OLIVETTI G, ABBI R, QUAINI F, KAJSTURA J, CHENG W, NITAHARA JA, QUAINI E, DI LORETO C, BELTRAMI CA, KRAJEWSKI S, REED JC, ANVERSA P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997; 336:1131–1141.

OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 hetero dimerises in vivo with a conserved homologue Bax that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 74:609-19.

ORON U, YAAKOBI T, ORON A, HAYAM G, GEPSTEIN L, WOLF T, RUBIN O, BEN-HAIM SA. Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low-energy laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2001; 28:204–11.

ORRENIUS, S. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human disease. *Journal of Internal Medicine*, 1995; 237: 529- 536

PALOJOKI E, SARASTE A, ERIKSSON A, PULKKI K, KALLAJOKI M, VOIPIO PULKKI LM, TIKKANEN I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: 2726-2731.

PEPLOW PV, CHUNG TY, BAXTER GD. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* 2012 Mar; 30(3):118-48.

PETROS AM, OLEJNICZAK ET, FESIK SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1644:83-94.

PFEFFER MA, BRAUNWALD E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81: 1161-72.

PFEFFER MA, PFEFFER JM, FISHBEIN MC, FLETCHER PJ, SPADARO J, KLONER RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979; 44:503-12.

PFEFFER MA, PFEFFER JM, STEIMBERG BS, FINN P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*. 1985; 72: 406-12.

PIRES D, XAVIER M, ARAUJO TR, JUNIOR JAS, AIMBIRE F, ALBERTINI R. Lowlevel laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti-and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers in Medical Science*. 2011; 26:85-94.

RIBEIRO SML, CAMPOS P, TIRAPEGUI J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. *Rev Farm Bioquím Univ São Paulo* 1995; 31(1): 21-8.

ROGER VL, WESTON SA, REDFIELD MM, HELLERMANN-HOMAN JP, KILLIAN J, YAWN BP, JACOBSEN SJ. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 2004; 292: 344-350.

ROSS J JR, HONGO M. The role of hypertrophy and growth factors in heart failure. *J Card Fail*. 1996;2:S121–S128.

RUPNARAIN C, DLAMINI Z, NAICKER S, BHOOJA K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem*. 2004;385:449-64.

SANTOS AA, HELBER I, et al. Doppler echocardiographic predictors of mortality in female rats after myocardial infarction. *J Card Fail*, v.15, n.2, Mar, p.163-8. 2009.

SARASTE A, PULKKI K, KALLAJOKI M, HENRIKSEN K, PARVINEN M, VOIPIO-PULKKI L. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95:320–3.

SCHULER M, MAURER U, GOLDSTEIN JC. p53 triggers apoptosis in oncogeneexpressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation.

Cell Death Differ. 2003; 10:451-60.

SCHWARZ K, SIMONI G, YU X, WIEDEMANN S, STRASSER RH. Apoptosis at a distance: remote activation of caspase-3 occurs early after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2006; 281:45-54.

SCORSIN M, GUARITA-SOUZA LC. O transplante celular no tratamento da insuficiência cardíaca. *Rev Bras Cir Cardiovasc.*, v.16, n.3. p. 183-186, 2001.

SELYE H, BAJUSZ E, GRASSOS S, MENDELL P. Simple techniques for the surgery occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*. 1960; 11: 398-407.

SILVA LM, SILVA CA, SILVA AD, VIEIRA RP, MESQUITA-FERRARI RA, COGO JC, ZAMUNER SR. Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom. *PLoS One*. 2016; 11(4): e0152890.

SILVA MP, BORTONE F, ARAUJO TR, SILVA, MP, COSTA, MS, JUNIOR, JAS. Inhibition of carrageenan-induced expression of tissue and plasma prekallikreins mRNA by low level laser therapy in rat paw edema. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. 2011;15:1-7.

SNITKOFF GG. Testes biológicos. In: Gennaro AR. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.556-68.

STELLER, H. Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science*, v. 267, p. 1445-1449, março de 1995.

SUTTON MGS, SHARPE N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction - Pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101: 2981-8.

SWYNGHEDAUW B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999; 79: 215-62.

TAKEMURA G, FUJIWARA H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther*. 2004; 104: 1-16.

TEIGER E, THAN VD, RICHARD L, WISNEWSKY C, TEA BS, GABOURY L, TREMBLAY J, SCHWARTZ K, HAMET P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* 1996; 97:2891–2897.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *SCience*, v.267, p. 1456- 1462, março de 1995.

TRESCH DD - The clinical diagnosis of heart failure in older patients. *J Am Geriatr Soc* 45:1128-1133, 1997.

TUBY H, MALTZ L, ORON U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med.* 2006; 38:682–88.

TUCCI PJF. Pathophysiological Characteristics of the Post-Myocardial Infarction Heart Failure Model in Rats. *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, p.1-5. 2010.

TUNSTALL-PEDOE H *et al.* Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *The Lancet.* 1999; 353 (9164): 1547-57.

VANDER HEIDEN MGV, THOMPSON CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* 1999;1:E209-16.

VASCONCELOS AC. Métodos aplicados ao estudo da Apoptose. Belo Horizonte: ICB-UFMG, 2001. 17p.

VERDE DR, Reed JC. Mitocôndrias e apoptose. *Ciência*. 1998; 281: 1309-1312.

WANG J, JENKINS S, LAMARTINIÈRE CA. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary glands following combinational exposure to bisphenol A and genistein. *BioMed Central.* 2014; 14:379.

WEBER KT. Targeting pathological remodeling: Concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation*, v. 102, p. 1342-1345, 2000.

WEISLEDER N, TAFFET GE, E CAPETANAKI Y. Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 769-774, 2004.

WYLLE AH. Death from inside out: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B - Biological Sciences*, v. 345 (1313), p. 237-241, 1994.

YAOITA H, OGAWA K, MAEHARA K, MARUYAMA Y. Attenuation of ischemia/ reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. 1998; *Circulation* 97:276-281.

XAVIER, M, DAVID, DR, DE SOUZA, RA, ARRIEIRO, NA, MIRANDA, H, SANTANA ET, SILVA, JAS, SALGADO, MAC, AIMBIRE, F, ALBERTINI, R. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*.2010;42: 553

ZORNOFFLAM, PAIVA SAR, DUARTE DR, SPADARO J. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: conceitos e implicações clínicas. *Arq Bras Cardiol* 2009; 92 (2): 157-64.

ZORNOFF LAM, SPADARO J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol*. 1997; 68: 453-60.