

**UNIVERSIDADE NOVE JULHO**

**Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação**

**Avaliação dos aspectos bioquímicos e morfológicos da  
ação do laser de baixa potência em camundongos *mdx*  
submetidos ao exercício de alta intensidade.**

**Aluna: Andréia Aparecida de Oliveira Silva**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho**

São Paulo – SP

2014

**UNIVERSIDADE NOVE JULHO**

**Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação**

**Avaliação dos aspectos bioquímicos e morfológicos da  
ação do laser de baixa potência em camundongos *mdx*  
submetidos ao exercício alta intensidade.**

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

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

São Paulo – SP

2014

**Silva, Andréia Aparecida de Oliveira.**

**Avaliação dos aspectos bioquímicos e morfológicos da ação do laser de baixa potência em camundongos mdx submetidos ao exercício de alta intensidade. / Andréia Aparecida de Oliveira Silva 2014.**

**66 f.**

**Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.**

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

**1. Camundongos mdx. 2. Músculo distrófico. 3. Creatina quinase. 4. Proteína carbonilada. 5. Laser de baixa potência. I. Carvalho, Paulo de Tarso Camillo de. II. Título**

**CDU 615.8**

São Paulo, 26 de fevereiro de 2014.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno(a): ANDREIA APARECIDA DE OLIVEIRA SILVA

Título da Dissertação: "AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS DA AÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM CAMUNDONGOS MDX SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE".

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



Membro: PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA

*Maricilia Costa*

Membro: PROF.DR. FLAVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO

*Flavio Aimbire Soares de Carvalho*

Membro: PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA

*Andrey Jorge Serra*

Membro: PROF.DR. ERNESTO CÉSAR PINTO LEAL JÚNIOR



## **Dedicatória**

**Aos meus pais, que me ensinaram o amor dos pequenos atos  
cotidianos.**

**Ao meu esposo, cada dia que passa amo cada vez mais.**

**Deus por mais esta etapa vencida.**

## **Agradecimentos,**

Meus sinceros agradecimentos,

Ao Professor Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho pela valiosa orientação e paciência nos momentos mais difíceis.

A Professora Dra. Kátia D' Angelis por abrir as portas do seu laboratório com tanto carinho e dedicação.

Aos professores: Dra. Cristiane Miranda França, Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal-Júnior, Dr. Rodolfo de Paula Vieira, Dra. Regiane Albetini, Dra. Stella Zamuner, Dr. José Antonio da Silva Junior, Dr. Andrey Serra, Dra. Maricilia Da Silva Costa, Dra. Iris Calado Sanches, Dra. Christiane Malfitano que contribuíram para realização do trabalho.

As alunas de Iniciação científica Joen Akemi Nishida e Érika Carolina de Paiva Neto.

As amigas do grupo Ms. Ana Carolina Alves Araruna, Ms. Carolina de Melo Rambo e Ms. Patrícia de Almeida.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Translacional – Uninove Vergueiro em especial a Ms. Danielle da Silva Dias por dispor de tempo e paciência para ensinar as técnicas descritas nesta tese.

A UNINOVE, Departamento de Pesquisa e Departamento de Saúde que possibilitou esta jornada.

A todos aqueles que, de maneira direta e indireta, contribuíram para realização deste trabalho.

## Resumo

Este estudo tem como objetivo verificar se a terapia laser de baixa intensidade (LLLT) é capaz de alterar parâmetros bioquímicos, funcionais e morfológicos em camundongos *mdx* submetidos ao exercício de alta intensidade sobre uma esteira elétrica. Utilizamos 21 camundongos C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J e 7 camundongos C57BL/10ScSn, todos com idades entre 4 semanas. Os animais foram divididos em 4 grupos: um grupo controle C57BL/10 n=7 (Controle C57BL); segundo grupo *mdx* controle n=7 (*mdx* controle), terceiro grupo *mdx* fadigados n=7 submetidos forçados exercício de alta intensidade em uma esteira (*mdx* fadiga); quarto grupo *mdx* n=7 com as mesmas características, mas que foram tratados com LLLT AsGaAl da marca DMC® modelo Photon Laser III, com potência de 30mW, comprimento de onda de  $\lambda$  808nm, 9J energia total, único ponto sobre o músculo gastrocnêmio da pata traseira (*mdx* LLLT) durante três dias consecutivos antes do exercício, as coletas de sangue foram realizadas logo após o exercício e na eutanásia (24hs após). As amostras de sangue dos camundongos *mdx* LLLT, apresentaram níveis significativamente mais elevados de marcadores de estresse oxidativo do que os camundongos “controle C57BL” e o LLLT reduziu a atividade creatina quinase e proteínas carboniladas, mesmo em condições de fadiga muscular. As atividades da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foram maiores nos *mdx* do que nos animais C57BL. O LLLT também reduziu significativamente o nível deste marcador. LLLT apresenta efeito benéfico sobre o músculo esquelético dos animais *mdx*, melhorando o desempenho destes animais. A aplicação do LLLT e os parâmetros de dose utilizado neste estudo não foram capazes de alterar a morfologia do músculo distrófico.

**Palavras-chaves:** camundongos *mdx*, músculo distrófico, creatina quinase, proteína carbonilada, superóxido dismutase.

## Abstract.

This study aims to determine whether the therapy of low intensity laser (LLLT) can alter biochemical, functional and morphological parameters in *mdx* subjected to high intensity exercise on the treadmill mice. And 21 mice used C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J C57BL/10ScSn 7 mice, all aged 4 weeks. The animals were divided into 4 groups: a control group n=7 C57BL/10 (C57BL Control); second set *mdx* control n=7 (*mdx* control), third group *mdx* fatigued n=7 underwent forced high-intensity exercise on a treadmill (*mdx* fatigue); fourth group *mdx* n=7 with the same characteristics, but were treated with LLLT AsGaAl DMC ® brand Model Photon Laser III, power 30mW, wavelength  $\lambda$  808nm, 9J energy a total single point on the gastrocnemius muscle hind paw (*mdx* LLLT) for three days consecutive before exercise, blood samples were taken immediately after exercise and euthanasia (24h after). Blood samples from *mdx* mice LLLT showed significantly higher levels of markers of oxidative stress than mice "C57BL control" and LLLT reduced the activity creatine kinase and protein carbonyls, even in conditions of muscle fatigue. The activities of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) were higher in *mdx* than in C57BL. The LLLT also significantly reduced the level of this marker. LLLT has beneficial effects on the skeletal muscle of *mdx* animals, improving the performance of these animals. The application of LLLT and dose parameters used in this study was not able to change the morphology of the dystrophic muscle.

Keywords: *mdx* mice, dystrophic muscle, creatine kinase, protein carbonyl, superoxide dismutase.



## **Lista de Figuras.**

<b>Figura 01.</b> Corte Histológico músculo estriado esquelético normal.....	13
<b>Figura 02.</b> Complexo glicoproteínas e distrofina.....	14
<b>Figura 03.</b> Padrão das fibras musculares distróficas.....	19
<b>Figura 04.</b> Coeficiente de absorção e comprimento de onda.....	21

## Lista de Abreviaturas / Siglas.

[ADP] -	Adenosina Difosfato
[AsGaAl] -	Arseneto de Gálio Alumínio
[ATP] -	Adenosina Trifosfato
[BL] -	Black
[CAT] -	Catalase
[CTX] -	Crotoxina
[CK] -	Cretina Quinase
[DGC] -	Complexo de Glicoproteínas
[DMD] -	Distrofia Muscular de Duchenne
[DNA] -	Ácido Desoxirribonucleico
[EROs] -	Espécies Reativas de Oxigênio
[GPX] -	Glutathiona Peroxidase
[H <sub>2</sub> O] -	Água
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]-	Peróxido de Hidrogênio
[hs] -	Horas
[IL-1 $\beta$ ] -	Interleucina 1 $\beta$
[iNos] -	Óxido nítrico sintase
[LDH]-	Lactato Desidrogenase
[LLLT] -	Laser de Baixa Potência
[PCr] -	Fosfocreatina
[TBARs] -	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
[SOD] -	Superóxido Dismutase
[O <sub>2</sub> ] -	Oxigênio

## Índice.

Dedicatória.....	04
Agradecimentos.....	05
Resumo.....	06
Abstract.....	07
Lista de Figuras.....	08
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	09
1. Introdução.....	11
2. Contextualização	
2.1. Caracterização das fibras musculares estriadas esquelética normais.....	13
2.2. Caracterização das fibras musculares estriadas esqueléticas distróficas.....	14
2.3. Dano Muscular .....	15
2.4. Modelo animal.....	18
2.5. Caracterização das fibras musculares dos camundongos <i>mdx</i> .....	19
2.6. Laser de Baixa Potência.....	22
2.7. Laser de Baixa Potência e o Dano Muscular.....	23
<b>3. Objetivos.</b>	
3.1. Objetivo Principal.....	28
3.2. Objetivos Específicos.....	28
<b>4. Resultados</b>	
4.1. Artigo.....	29
Low-Level therapy decreases levels of oxidative stress makers in <i>mdx</i> mice subjective to muscle fatigue by high-intensity exercise.	
<b>5. Discussão</b> .....	50
<b>6. Conclusão</b> .....	53
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	54
<b>8. Anexos</b> .....	63

## 1. Introdução.

As células musculares esqueléticas distróficas apresentam como principal característica a ausência da proteína distrofina responsável por manter a integridade estrutural do sarcolema. No músculo normal o dano normalmente ativa as células satélites e promove a regeneração muscular. Nas células distróficas o processo de regeneração e degeneração acabar por diminuir a população de células satélites, no qual em determinado momento as células musculares acabam por não regenerar mais, contribuindo para perda da função muscular. Embora nestas células ocorram degeneração e regeneração periódica do músculo. O músculo atrofiado é gradualmente substituído por tecido conjuntivo fibroso e gorduroso, que é uma das características da DMD (Collins *et al.*, 2005, Biressi & Rando, 2010).

Estudos em animais têm sido utilizados para determinar os fatores que estão envolvidos na degeneração muscular da DMD. Os camundongos *mdx* que apresentam uma mutação do gene distrofina são utilizados como modelo animal experimental para a DMD (Bulfield *et al.*, 1984; Watchko *et al.*, 2002). Estes camundongos *mdx* são expostos a diferentes tipos de metodologias experimentais que visam auxiliar na elucidação da fisiopatologia da DMD e no desenvolvimento de tratamentos apropriados.

O papel do laser de baixa potência (LLLT) no dano muscular tem se tornado alvo de diversos estudos (Silva *et al.*, 2010) tendo como base a ação fotobioestimulação no incremento do metabolismo celular no músculo, reduzindo os efeitos do estresse oxidativo, espécies reativas do oxigênio e atividade de CK, contribuindo para a prevenção de lesões musculares (Avni *et al.*, 2005; Rizzi *et al.*, 2006; Salam *et al.*, 2007). A utilização do LLLT em ratos normais submetidos a exercícios de alta intensidade como exemplo a natação forçada apresenta o papel de atenuar os níveis de CK e a apoptose celular, (Sussai *et al.*, 2009 e Arruda *et al.*, 2010).

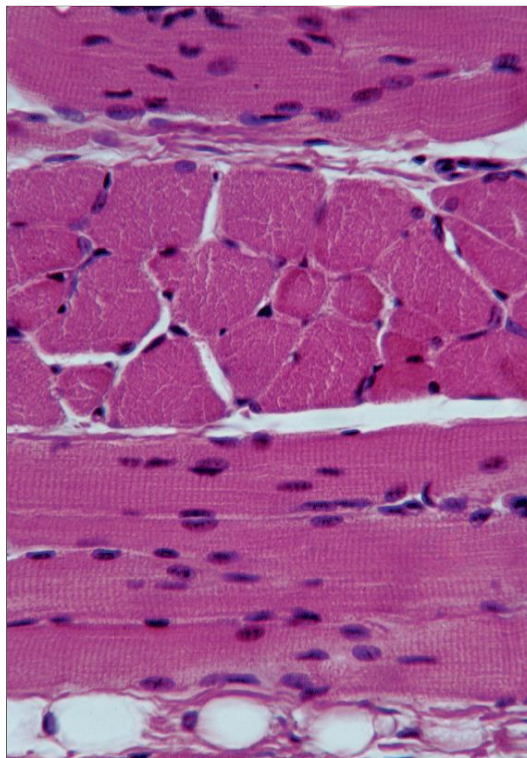
Dados da literatura encontrados até o momento não elucidam se a LLLT de alguma maneira pode contribuir para aceleração ou diminuição do processo degenerativo do músculo distrófico, sendo assim nenhum método é adotado.

Este trabalho tem como base a hipótese de que a LLLT venha contribuir com uma diminuição nos mecanismo de danos as fibras musculares estriadas esqueléticas distróficas, dos camundongos *mdx*.

## 2. Contextualização

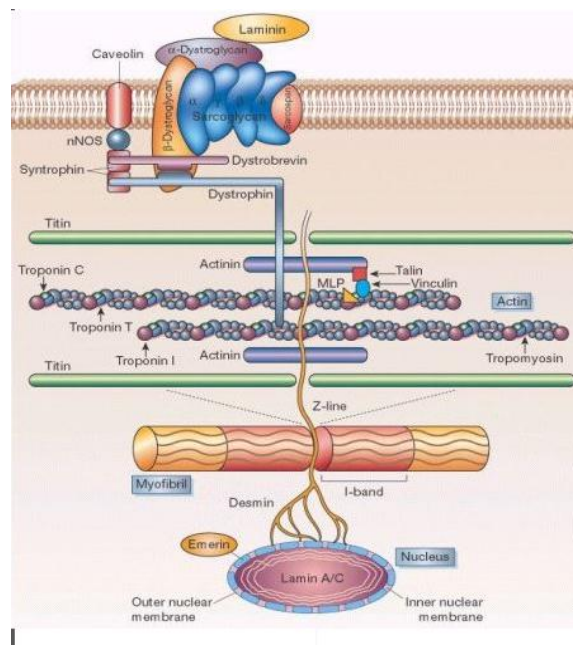
### 2.1. Caracterização das fibras musculares estriadas esqueléticas normais.

As células musculares esqueléticas iniciam a sua formação durante a quarta semana do desenvolvimento embrionário. As células mesodérmicas especializadas denominadas de mioblastos começam a divisão mitótica rápida. Os mioblastos migram e se fundem formando os miotubos. Na 9ª semana de gestação os núcleos dos mioblastos estão localizados centralmente e o crescimento celular continua pela adição de novos mioblastos (Moore et al. 2012). A fibra muscular estriada esquelética apresenta morfologia tubular, multinucleada, e núcleos periféricos figura 01. Além de organelas celulares típicas, o citoplasma (sarcoplasma) de uma fibra muscular contém uma matriz regular de unidades contráteis funcionais denominadas de sarcômeros constituído por finos filamentos de actina e filamentos grossos de miosina que, juntamente com as proteínas estruturais e reguladoras, estão dispostas longitudinalmente como miofibrilas.



**Figura 01.** Corte Histológico músculo estriado esquelético normal, coloração H&E. Junqueira e Carneiro 2004.

As miofibrilas estão associadas ao sarcolema ao longo da linha Z através de interações com complexos de proteína. Essa organização é mantida por diversas proteínas, como a desmina que liga entre as miofibrilas e a distrofina que liga os filamentos de actina às proteínas integrais da membrana plasmática, figura 02. O complexo glicoproteína associada à distrofina é uma estrutura macromolecular de proteínas associadas à membrana que inclui a distrofina e as proteínas sarcoglicano ( $\alpha$  -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, e  $\gamma$  - sarcoglicano), que mantêm a integridade das fibras estriadas (Lim & Campbell 1998; Anderson et al. 2012).



**Figura 02.** Complexo glicoproteínas e distrofina (Lim&Campbell 1998).

Estas estruturas transmitem forças contráteis entre os sarcômeros, o que evita rupturas do sarcolema, sincronizando a contração de fibras musculares no interior do músculo (Michele & Campbell, 2003; Rahimov & Kunkel, 2013).

## 2.2. Caracterização das fibras musculares estriadas esqueléticas distróficas.

A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é causada pela mutação do gene responsável pela expressão da proteína distrofina (Strober 2006). O complexo glicoproteína associada a distrofina que na sua ausência levam a perda da integridade das fibras que são responsáveis por proteger contra danos induzidos pela contração muscular (Anderson et al. 2012).

Nos pacientes não ocorre somente à ausência da expressão distrofina, mas também a desorganização dos componentes da DGC, resultando na perda da sinalização e funcionamento da fibra muscular e como consequência, o músculo fica suscetíveis a danos causados pelos radicais livres do que induzida por lesões musculares normais. Além disso, existe uma correlação negativa entre a expressão de distrofina e susceptibilidade a danos oxidativos, o que provoca menor teor de distrofina e maior oxidação de proteínas do músculo (Kaczor 2007).

Os sintomas fisiológicos da DMD tornam-se aparentes nos primeiros anos de vida, e a força muscular se diminui rapidamente na puberdade, geralmente resultando em morte precoce. Os sinais comuns de diagnóstico incluem aumento das concentrações de creatina no sangue (CK), aumento das taxas de regeneração das células musculares, as fibras musculares apresentam núcleos centralizados, tamanhos diferentes, que são provenientes de sucessivos processos degenerativos e regenerativos, edema mitocondrial e necrose (Rando et al. 1998, Nowak & Davies, 2004, Meadows et al. 2010).

### **2.3. Dano muscular.**

O músculo esquelético apresenta capacidade de adaptação em situações de contrações repetidas, sobrecarga mecânica e tensões, que podem levar a lesões musculares, ativando diversas vias de sinalização intracelular induzindo a adaptações celulares e moleculares, resultando em um melhor desempenho muscular (Gundersen et al. 2010; Miyazaki et al. 2009; Spangenburg et al. 2009; Schiaffino et al. 2007; Fluck et al. 2003).

O dano muscular pode ter como origem diversas situações como lacerações e contusões no músculo, tensão exercida sobre o músculo, práticas



esportivas ou atividades diárias, geralmente o processo de reparação na maioria dos casos é semelhante (Fukushima, 2001). O dano ao músculo ativa células satélites a promoverem a regeneração muscular. Nas células distróficas, o processo de regeneração e degeneração acabar por diminuir a população de células satélites, no qual em determinado momento as células musculares acabam por não regenerar mais, contribuindo para perda de função muscular. Embora nestas células ocorram degeneração e regeneração periódica do músculo (Collins et al. 2005, Biressi & Rando, 2010). Além disso, o músculo atrofiado é gradualmente substituído por tecido conjuntivo fibroso e gorduroso, caracterizando a DMD. O dano causado ao sarcolema provoca a liberação de proteínas musculares, tais como a creatina quinase (CK) e a lactado desidrogenase no soro. A concentração elevada de CK no sangue é considerada como principal indicador de processos degenerativos no músculo (Michele & Campbell, 2003; Meadows et al. 2011, Rahimov & Kunkel, 2013).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem causar danos celulares diretos e irreversíveis a macromoléculas, como proteínas, lipídios de membrana e o DNA. Outra importante consequência de EROS celular é a modificação reversível de cadeias laterais de proteínas que podem afetar muitos aspectos da função molecular (Terrill et al. 2012).

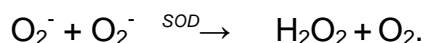
Estudos têm demonstrado um aumento nos marcadores de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil em sangue e tecidos (humanos e animais) durante e após a lesão muscular (Pattwell et al. 2004). Embora necessário para a defesa da célula e funções celulares, as EROs, quando em excesso, podem provocar um desequilíbrio entre a produção e a capacidade de defesa antioxidante, estresse oxidativo e agredir os constituintes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Gutteridge & Halliwell, 2010). A distrofina presente na célula muscular é altamente susceptíveis aos danos celulares, devido à perda de integridade da membrana, quando expostos a EROS, o que provoca fadiga muscular e outras co-morbidades em pacientes com DMD (Kaczor et al. 2007).

O estresse oxidativo pode ser definido como distúrbio pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes, levando ao dano muscular e a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. O principal alvo do estresse oxidativo pode variar dependendo das células, tipo de estresse imposto e intensidade do mesmo. O estresse oxidativo intenso pode produzir danos irreversíveis levando à morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Dentre os antioxidantes enzimáticos responsáveis pela detoxificação das espécies ativas de oxigênio salientam-se três enzimas: superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), (Sies et al. 1997).

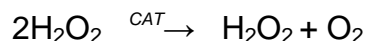
A (SOD) é uma enzima que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio.

Reação de metabolização do Radical Superóxido pela SOD:



Nos peroxissomas, há presença de CAT é responsável por reduzir o peróxido de hidrogênio à água.

Reação de metabolização  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela catalase:



Para determinação do papel dos EROs no envelhecimento em mamíferos estudos de Schriener em 2005 produziram camundongos transgênicos que expressam a CAT em grande quantidade e observaram que a expectativa de vida foi maior, os danos relacionados às mitocôndrias foram reduzidos e as patologias cardíacas se tornaram tardias de acordo com a idade.

Após a lesão muscular inicial, o estresse oxidativo pode ser aumentado devido a vários locais de produção de EROs no interior da célula muscular traumatizada. As principais fontes primárias de radicais livres após um trauma inclui-se a mitocôndria, xantina oxidase e o sistema NADPH oxidase (Reid et al. 2008). Como defesa o músculo esquelético é capaz de produzir a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase, apesar das enzimas permanecerem estáveis em situações basais, podem ser tornar instáveis para prevenção da lipoperoxidação (Marks et al. 1996, Robertson et al. 2005).

Os danos as proteínas podem ser causados pela oxidação dos EROs (espécies reativas de oxigênio) ou por produtos da lipoperoxidação. O principal ERO com capacidade de se ligar a aminoácidos das proteínas é o oxigênio singlete, porém outros radicais também podem reagir, sendo essas reações catalisadas por metais de transição como o ferro, as proteínas passam a ter uma ligação a mais, com um novo oxigênio que influencia em sua polaridade, ficando propensa à agregação. Grandes agregados podem se formar, dando origem a fibrilas insolúveis, a maioria quando oxidada é enviada para os proteassomos e lisossomos onde ocorre sua hidrólise, havendo nova produção de enzimas e menor atividade, até que ocorra a substituição. A carbonilação das proteínas tem sido muito utilizada como marcador oxidativo em proteínas, no qual também reflete nos danos celulares (Dalle-Donne et al. 2006 e Giustarini et al. 2009).

#### **2.4. Modelo Animal.**

Estudos em modelos animais são utilizados para determinar os fatores que estão envolvidos na degeneração muscular da DMD. Alguns animais como o camundongo, gato e cão são usados como modelos experimentais por apresentarem alteração no gene que codifica a proteína distrofina e algumas raças de cães, como o labrador golden retriever, rottweiler, fox terrier, selter e pointer alemão. A progressão da doença é acompanhada pelo enfraquecimento e contratura muscular e seguida de morte antes da vida adulta. Nos felinos, a deficiência de distrofina ocasiona o óbito prematuro devido à hipertrofia da língua, parte caudal e do diafragma (Watchko et al. 2002).

Os músculos dos membros destes dos camundongos *mdx* desenvolvem lesões com necrose profunda, infiltração de células do sistema imunológico, inflamação e perda de função, com o avançar da idade, a patologia progride a ritmo muito baixo em relação à doença humana (Bulfield et al. 1984, Dangain & Vrbova, 1984; Disatnik et al. 1998, Pastoret & Sebillé, 1993, 1995).

O camundongo *mdx* representa uma mutação espontânea de uma colônia de C57BL/10 ScSn, a mutação pontual ocorre na região HqBpa do

cromossomo X (Smith & Schofield, 1994), ocasionando a substituição das bases nitrogenadas, citosina por timina no par de nucleotídeos 3185 do exon 23 do gene da distrofina. Isto determina um código de terminação no lugar da Glutamina, gerando uma proteína truncada com 27% do tamanho normal e que não é estável (Sicinski, et al. 1989). Existem camundongos *mdx* com fenótipos diferenciados que foram originados por outras mutações no gene da distrofina. O camundongo *mdx* nocaute, para o exon 52 da distrofina (*mdx*<sup>52</sup>) foi gerado para não permitir a expressão das quatro isoformas de distrofina e apresenta a doença muito mais grave (Haslett, et al. 2005).

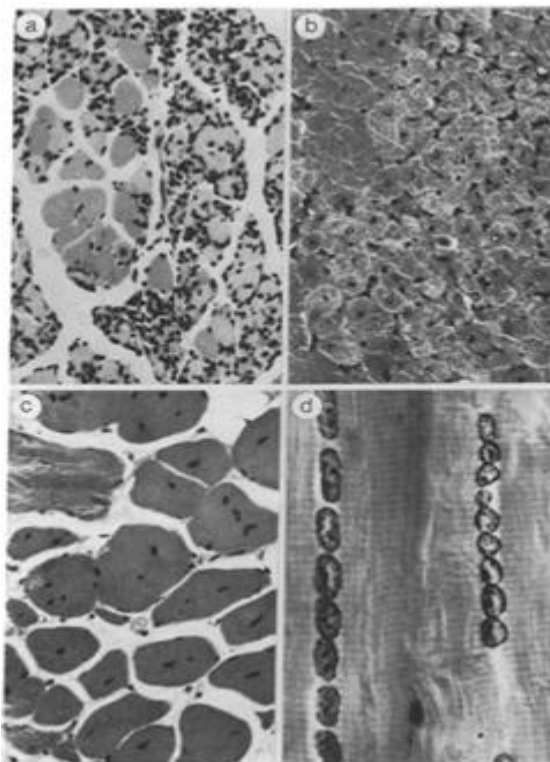
## **2.5. Caracterização das fibras musculares dos camundongos *mdx*.**

O camundongo *mdx* também apresentam níveis muito elevados da enzima CK no soro, que indica extensa degeneração muscular. Contudo, esses animais desenvolvem fenótipo benigno da DMD com poucos sintomas clínicos aparentes, apresentando sobrevida praticamente normal e regeneração eficiente do tecido muscular (Bulfield & Siller et al. 1984).

O músculo estriado esquelético dos camundongos *mdx* apresenta poucas alterações histológicas no período após o nascimento, que inicia-se com a fase de mionecrose (Cullen & Mastaglia, 1980) acompanhada por intenso infiltrado inflamatório constituído principalmente de macrófagos, linfócitos T e raros linfócitos B (Mcdouall et al. 1990; Spencer et al. 1997; Lagrota-Candido, et al. 2002).

Na oitava semana de vida, a mionecrose é parcialmente compensada pela regeneração das miofibrilas, sendo evidente o número elevado de fibras regeneradas com nucleação central, figura 03 (Bulfield et al. 1984, Nonaka, 1998). Nos animais adultos com 24 semanas, ainda ocorre uma discreta mionecrose com redução na regeneração e aumento na fibrose. Após 52 semanas do nascimento, os camundongos *mdx* apresentam declínio significativo do peso corporal e da massa muscular (Pastoret et al. 1995). As fibras musculares do *mdx* idoso apresentam grande variação no tamanho,

inclusive com miofibrilas atrofiadas, fragmentadas e aumento das fibras colágenas no endomísio (Pastoret et al. 1995; Lagrota Candido, Vasconcellos et al. 2002).



**Figura 03.** Padrão das fibras musculares distróficas descritas por Bulfield et al. 1984.

Os músculos dos camundongos *mdx* são utilizados como modelo experimental para o estudo da DMD, pois sofrem alterações estruturais que reproduzem a fisiopatologia da doença (Pastoret e Sebille, 1995; Hayes e Willians, 1997). As alterações observadas no músculo dos camundongos *mdx* são a presença de necrose muscular e fraqueza muscular, além do infiltrado de tecido conjuntivo e do acúmulo de tecido adiposo (Pastoret e Sebille, 1995).

A necrose no tecido muscular dos camundongos *mdx*, segundo Asai e colaboradores (2007), pode ser causada tanto pela lesão do tecido muscular quanto pela diminuição do fluxo sanguíneo durante a contração muscular, o que determinaria um processo isquêmico do tecido muscular. Isto significa que durante o exercício, o mecanismo fisiológico de vasodilatação dos vasos

sanguíneos que irrigam os músculos, está prejudicado nos camundongos *mdx*, o que agravaria o quadro de degeneração do tecido muscular destes animais.

Embora a causa da DMD seja a deficiência de distrofina, uma série de patologias secundárias podem contribuir para o fenótipo. A presença dos radicais livres tem caracterizado o aumento das lesões nos músculos estriados esqueléticos de pacientes com DMD e nos camundongos *mdx* (Jackson et al. 1984; Mechler et al. 1984; Hauser et al. 1995; Haycock et al. 1996).

O aumento do estresse oxidativo ocorre normalmente antes da necrose observado em apenas 3 semanas de idade nos camundongos *mdx* (Disatnik et al. 1998), sugerindo que os radicais livres contribuam para o aumento do estresse oxidativo antes da necrose e a deficiência funcional foi observado em apenas 3 semanas de idade em camundongos *mdx* (Disatnik et al. 1998). Dado que isto ocorre antes da necrose inicial sofrida pelos músculos na quarta semana, sugerindo que os radicais livres contribuem para a patologia da doença. Além disso, mesmo em idades jovens, o aumento da susceptibilidade a danos dos radicais livres foi demonstrada em camundongos *mdx* por Rando et al. 1998. Vários fatores em conjunto, sugerem que o problema fundamental na DMD pode ser o sistema antioxidante comprometido, permitindo a formação de radicais livres e danos subsequentes, incluindo a diminuição da função muscular. Este estresse oxidativo inicial pode levar a necrose do ataque inicial visto nos camundongos *mdx*. Enquanto o componente dos radicais livres da doença tem sido descritos na literatura, os ensaios clínicos, utilizando antioxidantes não se apresentam efetivos para atenuar os sintomas da doença (Fenichel et al. 1988). Isso pode indicar que o dano oxidativo tem um papel fundamental no início e na progressão da doença.

No músculo distrófico, a atividade da superóxido dismutase é maior ao comparar com o músculo normal (controle) observado por Kaczor et al. 2007. O maior local de produção de superóxido é nas mitocôndrias (Viola & Hool, 2010), que no músculo esquelético distrófico pode contribuir para um mecanismo de melhora.

Ao avaliar atividade das enzimas antioxidantes e produtos da peroxidação lipídica (TBARS) em camundongos *mdx* e animais controles. O

TBARS e as atividades da superóxido dismutase, glutathione peroxidase, desidrogenase de glicose-6-fosfato e catalase foram consistentemente mais elevados nos músculos dos camundongos *mdx*, estes dados sugerem que o estresse oxidativo pode ser constitutivamente presente no músculo *mdx*, mas talvez não seja o principal mecanismo patogênico. A ausência de distrofina faz com que o músculo permaneça mais suscetível aos danos causados pelos radicais livres, quando comparado por lesões musculares normais. Além disso, existe uma correlação negativa entre a expressão de distrofina e suscetibilidade aos danos oxidativos, diminuindo a quantidade de distrofina e por consequência apresentando maior oxidação das proteínas no músculo (Ragusa et al. 1997, Kaczor et al. 2007).

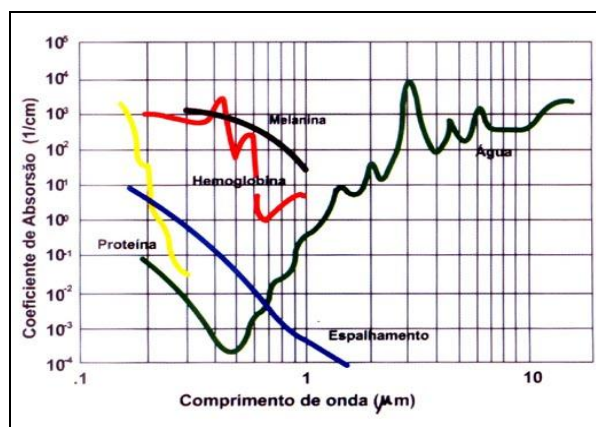
## **2.6. Laser de Baixa Potência.**

A fototerapia envolve o uso terapêutico da luz no tratamento de várias condições patológicas e lesões músculo esquelética. A investigação sobre a capacidade de terapia de luz em modular processos fisiológicos associados com lesão e cura produziu resultados promissores. Os processos moduladores associados com fototerapia, muitas vezes são chamados fotobioestimulação, que envolve o uso da luz para induzir alterações bioquímicas no tecido em situações de estímulo ou inibição de um conjunto ou de um determinado biomarcador (karu, 1999).

O uso do laser de baixa potência (LLLT) tem se expandido recentemente com o objetivo de atender áreas da medicina que não foram previamente consideradas como as aplicações usuais, como cicatrização de feridas e doenças inflamatórias, lesões musculares e a fadiga muscular (Ferraresi, 2012).

A terapia LLLT se baseia na absorção dos fótons pelos cromóforos mitocondriais ou por sua membrana celular que produz uma alteração na homeostasia celular, produzindo eventos conseguintes, alguns componentes da cadeia respiratória, os cromóforos primários que absorvem a luz promovendo aumento do metabolismo celular pela síntese do ATP, alterando o

fluxo celular entre os íons sódio, potássio e cálcio no citoplasma (Karu,1988; Lubart et al. 1997). O efeito do LLLT no metabolismo celular se deve a ação de receptores da cadeia respiratória. A efetividade do laser em baixas doses se explica pela ação da oxi-redução, regulando o metabolismo celular (Karu, 1989).



**Figura 04.** Coeficiente de absorção e comprimento de onda, imagem traduzida (Cotton et al. 2004).

A Associação entre o laser e os tecidos biológicos promovem reações atérmicas, produzindo o efeito fotoquímico, este efeito está associado à absorção de luz por substâncias cromóforas encontradas nos tecidos e nos componentes intracelulares tendo como alvo principal os citocromos presentes nas mitocôndrias. Para lasers de 488 e 515nm (argônio), tem-se a hemoglobina como principal cromóforo, enquanto que para 10.600nm (CO<sub>2</sub>), a água. Para o 632,8 nm(He-Ne), 904 nm(GaAs) e 630-830nm (GaAlAs), ou seja, comprimentos na região do vermelho e infravermelho próximo, não apresentam fortes cromóforos, possibilitando maior capacidade de penetração, figura 04 (Karu, 1999, Cotton et al, 2004, Jacques et al. 2013).

## 2.7. Laser de baixa potência e dano muscular.

A ação do LLLT no dano muscular tem se tornado alvo de indagação de diversos estudos (Silva et al. 2010) tendo como base algumas evidências



científicas, da ação fotobioestimulação no incremento no metabolismo celular no músculo, promovendo alterações estruturais que resultam no aumento da membrana mitocondrial, formação de mitocôndria maiores, atividades enzimáticas envolvidas na cadeia respiratória, aumentando a quantidade de ATPs fornecidos para as células, redução dos efeitos do estresse oxidativo, espécies reativas do oxigênio e atividade de CK, contribuindo para a prevenção de lesões musculares (Avni et al. 2005; Rizzi et al. 2006; Salam et al. 2007) .

Os efeitos da fototerapia também podem retardar o aparecimento do cansaço, e por consequência, a fadiga muscular, redução do lactato sérico, após exercícios forçado, ou seja, proporcionar o efeito protetor, no qual ocorre à melhora de eventos que normalmente são comuns na ausência de qualquer medida terapêutica, como exemplo a recuperação da força muscular após o exercício, as alterações metabólicas como a falta de ATP e glicogênio, o estresse oxidativo, hipóxia tecidual, limitação do processo inflamatório e por consequência o dano muscular (Lubart et al. 2005; Leal Junior et al. 2010; Lopes-Martins et al. 2006).

Rennó et al, 2011 comparou o LLLT e o ultra-som no músculo estriado esquelético após criolesão, observou que ambas terapias apresentaram efeitos positivos quanto recuperação da lesão quando comparados com os animais não tratados.

No trabalho de Rizzi et al. em 2006 os autores observaram que o LLLT foi capaz de reduzir a resposta inflamatória induzida por trauma e bloquear os efeitos de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de liberação da ativação do NF-kB diminuindo a via de sinalização inflamatória, a redução de óxido nítrico sintase (iNOS) e aumento expressão de colágeno, minimizando os danos secundários ao músculo.

A utilização do LLLT em ratos normais submetidos a exercícios de alta intensidade como exemplo a natação forçada apresenta o papel de atenuar os níveis de CK e a apoptose celular, (Sussai et al. 2009).

Estudos realizados em seres humanos demonstraram os efeitos significativos ao utilizar o LLLT 655-nm e 830nm anteriormente a realização do exercício, além de haver diminuição da fadiga muscular também houve melhora

na recuperação muscular (Leal et al. 2008 e Leal et al. 2009). Fernandes et al, 2012 observou que a reparação muscular é regulada por fatores de crescimento e citocinas e verificou que a terapia LLLT foi capaz de diminuir a expressão de IL-1 $\beta$  durante a reparação músculo estriado esquelético após lesão aguda em ratos wistar.

França et al, 2013 verificaram que a terapia LLLT em ratos wistar diabéticos pode ter efeito positivo sobre a morfologia do músculo esquelético durante processo de reparação do tecido, aumentando a reorganização das fibras musculares e do perimísio, reduzindo fibrose. Silveira et al, 2013 demonstrou que as espécies reativas ao oxigênio apresentam-se aumentadas em músculos de ratos wistar lesionados, mas no grupo tratado com o LLLT foi capaz de diminuir produção de ânion superóxido, níveis de TBARS e a atividade da SOD.

No trabalho de Silva et al, publicado em 2012 foi investigado o efeito do laser arseneto de gálio (GaAs) nas doses de 3J e 1,5J em camundongos C57BL6 que com lesão muscular induzida pela crotoxina (CTX), a dose de 3J aumentou significativamente a regeneração das células satélites, miofibrilas, a expressão da Myo-D e miogenina quando comparados com grupo controle, sugerindo que a dose de 3J melhora o músculo estriado esquelético lesionado.

Dentre os principais mecanismos de ação do LLLT que envolve a reparação e o retardo do dano muscular, autores descrevem os eventos fotoquímicos e fotofísicos das mitocôndrias, dentre elas o aumento do tamanho da organela, maior síntese de ATP que por consequência favorece o metabolismo aeróbio reduzindo a fadiga metabólica. Se os exercícios foram de alta intensidade, normalmente apresentam um metabolismo anaeróbio com a produção de lactato, o desempenho muscular poderá ser melhorado e a fadiga muscular reduzida (Ferraresi et al. 2011, Ferraresi et al. 2012).

Considerando os efeitos do LLLT nas mitocôndrias, algumas hipóteses tem sido proposta na literatura e foram relatadas por Ferraresi et al. 2012.

I – Mitocondrial: o LLLT pode aumentar a atividade mitocondrial e a síntese de ATP.

II – Ressíntese da Fosfocreatina: o ATP é utilizado por todas as células, a energia necessária para realização dos exercícios de alta intensidade consomem grandes quantidades de ATPs. Tanto o ATP quanto a PCr, ao terem os seus grupamentos fosfatos removidos, liberam uma grande quantidade de energia, que imediatamente fica disponível ou é acoplada à ressíntese de ATP. Ao se exercitar, as reservas de ATP são imediatamente clivadas, aumentando a quantidade de ADP e Pi livres. O aumento de ADP sinaliza a ativação da creatinafosfoquinase (CPK), que é o responsável pela clivagem da fosfocreatina, liberando a energia necessária para a ressíntese do ATP. A fosfocreatina pode ser sintetizada novamente, a partir de Pi e creatina, através da energia liberada pela desintegração de ATP, proveniente da respiração aeróbia.

III – Oxidação do Lactato pela Mitocôndria: o lactato tem sido utilizado para caracterizar a fadiga muscular durante os exercícios de alta intensidade em situação no qual o oxigênio se torna insuficiente ou ocorre um atraso na ressíntese do ATP, o piruvato é reduzido para lactato desidrogenase no processo glicólise, a reação é catalisada pelo LDH do citoplasma com a produção de lactato, este é transportado para matriz mitocondrial por meio do NAD e o lactato será oxidado para piruvato. O NAD reduzido a NADH fornecem prótons elétrons para síntese de ATP.

O dano muscular pode acarretar várias alterações na fibra muscular, como as células musculares são extremamente ricas em mitocôndrias, ou seja, o LLLT deve ser altamente benéfico em lesões musculares. A capacidade do LLLT em estimular as células satélites pode auxiliar na reparação muscular. Além disso, o LLLT também é capaz de reduzir o processo inflamatório e diminuir o estresse oxidativo durante o processo de fadiga muscular. Esta terapia pode beneficiar os atletas, na recuperação muscular, em pacientes com DMD, ou com lesões de diversas origens (Yin et al. 2013).

De acordo com literatura pesquisada há muitas evidências científicas que demonstram os efeitos biológicos positivos do LLLT sobre músculo esquelético, mas não encontramos dados no que se refere à utilização do LLLT, que determina qual o comprimento de onda, a dose de energia, potência

e tempo necessário para estimular a melhora do músculo distrófico e que, de alguma maneira possa contribuir para aceleração ou diminuição do processo degenerativo muscular em portadores da DMD, sendo assim nenhum método é adotado para a melhora destes pacientes.

### **3. Objetivo.**

#### **3.1. Objetivo Principal:**

O presente projeto tem por objetivo avaliar os aspectos bioquímicos, e morfológicos, da ação do LLLT 808nm em camundongos C57black10 e camundongos *mdx* submetidos ao exercício de alta intensidade.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

Avaliar se a LLLT de baixa potência é capaz de alterar os seguintes parâmetros:

- I. Bioquímicos: dosagem da enzima CK como marcador de lesão muscular e estabelecer uma correlação entre o estresse oxidativo baseado nas dosagens de proteínas totais, superóxido dismutase (SOD) e proteínas carboniladas.
- II. Funcionais: correlacionar o tempo e velocidade máxima percorrida durante o exercício de alta intensidade.
- III. Morfométricos: com base na microscopia de luz, avaliar os aspectos morfológicos das fibras musculares estriadas esqueléticas.

#### 4. Resultados.

##### Artigo:

Andreia Ap. de Oliveira Silva<sup>1</sup>, Katia de Angelis Lobo D Avila<sup>1,3</sup>, Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior<sup>1,2</sup>, Rodolfo de Paula Vieira<sup>1,3</sup>, Regiane Albertini<sup>1,2</sup>, Cristiane Miranda França<sup>2</sup>, Danielle da Silva Dias<sup>1</sup>, Joen Akemi Nishida<sup>1</sup> and Paulo de Tarso Camillo de Carvalho\*<sup>1,2</sup> Low-level laser therapy decreases levels of oxidative stress markers in *mdx* mice subjected to muscle fatigue by high-intensity exercise. Submetido à **PLos One**

Os resultados descritos no estudo acima demonstraram a eficácia da terapia com LLLT em reduzir os marcadores de estresse oxidativo e os níveis da enzima CK em camundongos *mdx*, submetidos ao exercício de alta intensidade, apresentando efeito benéfico sobre o músculo esquelético, melhorando o desempenho dos animais distróficos.

## Low-level laser therapy decreases levels of oxidative stress markers in *mdx* mice subjected to muscle fatigue by high-intensity exercise

Andreia Ap. de Oliveira Silva<sup>1</sup>, Katia de Angelis Lobo D Avila<sup>1,3</sup>, Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior<sup>1,2</sup>, Rodolfo de Paula Vieira<sup>1,3</sup>, Regiane Albertini<sup>1,2</sup>, Cristiane Miranda França<sup>2</sup>, Joen Akemi Nishida<sup>1</sup> Danielle da Silva Dias<sup>1</sup> and Paulo de Tarso Camillo de Carvalho\*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil; <sup>2</sup> Postgraduate Program in Biophotonics Applied Health Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil; <sup>3</sup> Postgraduate Program in Medicine, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil

\*E-mail: paulo.tarso@uninove.br

### Abstract

This study was designed to determine if the levels of oxidative stress markers are influenced by low-level laser therapy (LLLT) in *mdx* mice subjected to high-intensity exercise on an electric treadmill. We used 21 C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J mice and 7 C57BL/10ScSn mice, all aged 4 weeks. The mice were divided into 4 groups: a control group of normal, wild-type mice (WT); a control group of untreated *mdx* mice (control *mdx*); a third group of *mdx* mice that underwent forced high-intensity exercise on a treadmill (fatigue *mdx*); and another group of *mdx* mice (LLLT *mdx*) with the same characteristics that were treated with LLLT at a single point on the gastrocnemius muscle of the hind paw. The *mdx* mice treated with LLLT showed significantly higher levels of oxidative stress markers than WT mice, and LLLT was able to reduce these levels of markers even in conditions of muscle fatigue. The activities of the antioxidant enzyme superoxide dismutase were higher in *mdx* mice than in WT mice. LLLT also significantly reduced the level of this marker. LLLT had a beneficial effect on the skeletal muscle of *mdx* mice and improved the performance of these animals. The three application of LLLT and the dose parameters used in this study were not able to change the morphology of a dystrophic muscle.

## Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by mutations in the gene encoding dystrophin, a subsarcolemmal protein functioning within the dystrophin-associated glycoprotein complex [1-3]. The dystrophin-associated glycoprotein complex is a macromolecular structure of membrane-associated proteins that includes dystrophin and the sarcoglycan proteins ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, and  $\gamma$ -sarcoglycan), which maintain fiber integrity and protect against contraction-induced muscle damage [4].

The absence of dystrophin in skeletal muscle makes the muscle more susceptible to free radical-induced damage than normal muscular injuries. In addition, there is a negative relation between dystrophin expression and susceptibility to oxidative damage, which causes lower dystrophin content and greater muscle protein oxidation [5].

The physiologic symptoms of DMD become apparent within the first few years of life, and muscle strength quickly deteriorates by puberty, usually resulting in early death. The common diagnostic signs of DMD include increased concentrations of blood creatine kinase (CK), increased rates of myofiber regeneration, centrally located myofiber nuclei, mitochondrial swelling, and ultimately myofiber necrosis [6]. Reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress may cause cellular damage by direct and irreversible damage to macromolecules such as proteins, membrane lipids, and DNA. Another major consequence of cellular ROS is the reversible modification of thiol side chains of proteins that may affect many aspects of molecular function [7]. Dystrophin-deficient myotubes are highly susceptible to cell damage, particularly due to the loss of membrane integrity when exposed to ROS, which causes muscle fatigue and other comorbidities in persons with muscular dystrophy [5]. Acute fatigue can result from short-term excessive workload in myopathic patients after an eccentric exercise. Often, rupture of the sarcolemma and loss of sarcoplasmic enzymes, e.g., CK [8], occur. An imbalance between ROS production by oxidation and ROS reduction by antioxidant systems induces intracellular oxidation, leading to the initiation and progression of age-related stress diseases, including diabetes mellitus, hypertension, atherosclerosis, osteoporosis, and neurodegenerative diseases [9].

The mechanisms by which ROS play a role in the development of fatigue are not fully understood; however, it is known that oxidative stress leads to a reduction in muscle



contractile function resulting in muscle fatigue [10]. Several studies have demonstrated that low-level laser therapy (LLLT) has analgesic effects [11-13], modulates the levels of inflammatory mediators, and has anti-inflammatory effects [14-16]. Furthermore, recent animal studies [17-19] and human studies [10, 20, 21] have hinted at the possibility of LLLT in lowering the levels of CK, other muscle damage markers, and oxidative stress after exercise. Therefore, this study was designed to determine whether the levels of oxidative stress markers could be influenced by LLLT in *mdx* mice subjected to high-intensity exercise training on an electric treadmill. Therefore, we investigated whether LLLT could produce changes in the levels of oxidative stress markers (protein carbonyl content) and the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) in the serum of *mdx* mice, as well as changes in CK levels and in the histology of the soleus and gastrocnemius muscles.

## **Materials and Methods**

### **Ethics statement**

All experimental procedures were performed in accordance with the standards of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and the Research Ethics Committee of the Universidade Nove de Julho-UNINOVE approved the research protocol (no. AN 0023-2011).

### **Animals**

The cohort consisted of 28 mice (*Mus musculus*); 7 wild-type mice (C57BL/10ScSn) and 21 C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J mice, all about 4 weeks of age were studied [22, 23]. The animals were obtained from the Breeding Center of Laboratory Animals (Cecal), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Manguinhos, Rio de Janeiro, and kept in a vivarium (UNINOVE/Unit Vergueiro).

### **Experimental design**

The mice were divided into 4 groups: a control group of normal, wild-type mice (WT); a control group of untreated mdx mice (control *mdx*); a third group of mdx mice that underwent forced high-intensity exercise on a treadmill (fatigue *mdx*); and another group of mdx mice (LLLT *mdx*) with the same characteristics that were treated with LLLT at a single point on the gastrocnemius muscle of the hind paw.

Figure 1 Shows the experimental time for each group according to lineage. The *mdx* fatigue LLLT group received LLLT for 3 consecutive days, and the *mdx* fatigue group was manipulated by simulating the treatment but with the power turned off. On the last day of therapy, after the application of LLLT, the animals were subjected to a forced exercise task on a treadmill, and another blood test was performed on the same day. After 24h, the animals were anesthetized for blood collection and were euthanized for the removal of the gastrocnemius and soleus muscles.

### **High-intensity exercise protocol**

The animals were made to run on a treadmill (Inbrasport Model KT-4000 CI adapted for mice; Porto Alegre, Brazil). For the effectiveness of the method, the following protocol was carried out: every 2 min, the speed was increased by 0.1 km/h until the mouse was exhausted (which was determined as when the animal was unable to continue running at the predetermined speed and/or fell), and the experiment was repeated when the animal stood still for >10 s thrice in a row [24].

### **Low-level laser application and parameters used**

The laser used was aluminum gallium arsenide (Photon Laser III; DMC, São Carlos, Brazil), and the data relating to the parameters used are summarized in Table 1. The laser was applied transcutaneously to a single point, on the foreleg in the posterior region of the gastrocnemius muscle on 3 consecutive days according to the modified protocol [17].

### **Blood collection and euthanasia**

Twenty-four hours after laser application, blood was collected in glass tubes through the orbital venous plexus (microhematocrit) after the animals were given one drop of anesthetic eye drops (Allergan, São Paulo, Brazil), [22]. The mice were euthanized by intraperitoneally injecting an overdose (100 mg/kg) of thiopental (Thiopentax; Cristália, Itapira, SP, Brazil) and 10 mg/mL lidocaine (Xylestesin; Cristália Itapira SP-Brazil). The blood samples were separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min at 4°C in a refrigerated centrifuge (5804R; Eppendorf, Hamburg, Germany).

### **Collection of muscle tissues**

The gastrocnemius and soleus muscles of the right hind paw were collected and stored in 10% buffered formalin for histological processing, and then hematoxylin and eosin staining was performed as a routine method. Slides were photographed, and the morphology of the skeletal striated muscle fibers was analyzed (Eclipse E-200; Nikon, Tokyo, Japan).

### **Creatine kinase**

Quantification of the total CK activity in plasma was performed using the CK-NAC kit. The working reagents were used according to the amount of plasma obtained during blood collection. We used a 96-pore quartz plate and reduced the amount of plasma used to 40 µL, and the amount of the AOS working reagent (250 µL) used ranged from 10 µL to 1 mL, according to the manufacturer's instructions (Laborlab; Guarulhos, SP, Brazil) [17].

### **Protein carbonyl**

The assay for the detection of protein carbonyl groups is one of the techniques used to determine the presence of oxidatively modified proteins. This assay is based on the reaction of oxidized proteins in blood plasma with 2,4-dinitro-phenyl-hydrazine (DNPH) in an acid medium, followed by successive washes with acid and organic solvents and a final incubation with guanidine. The carbonyl absorbance was measured using a

spectrophotometer Cary; Varian (Palo Alto, California USA) at 360 nm, in a reaction medium containing the following reagents: 6 M guanidine hydrochloride in 2.5 M hydrochloric acid (HCl), pH 2.5; 2,4-DNPH in 2.5 M HCl; 20% trichloroacetic acid (TCA); 10% TCA; ethanol- ethyl acetate 1:1 (v/v). The plasma samples were then diluted with 25–75  $\mu$ L of saline. A protein standard curve with albumin as the standard was created using absorbance values that were obtained at 280 nm using a BIOESPECTRO spectrophotometer [31].

### **Superoxide dismutase**

The technique used for the detection of SOD was based on the inhibition of the reaction of superoxide by pyrogallol. As this technique cannot be used to determine the concentration of the enzyme or its activity in terms of the amount of substrate consumed per unit time, quantification was done in relative units. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of oxidation of the detector (pyrogallol) by 50%. The oxidation of pyrogallol results in the formation of a colored product, which was detected spectrophotometrically at 420 nm (Biospectro) for 2 min. SOD activity was determined by measuring the rate of formation of oxidized pyrogallol. In the reaction medium, 5  $\mu$ L plasma and 1 of 983 mM Tris-phosphate buffer was used at 50 mmol/L (pH 8.2), 8  $\mu$ L of pyrogallol and 24 mmol/L 4 of 1 of catalase to 30 mmol/L. This curve was used as a blank. In addition, a standard curve was constructed using three different concentrations of SOD (0.25 U, 0.5 U, and 1 U), from which the equation of the line used for the calculations was obtained [24].

### **Statistical analysis**

Data were tabulated using Microsoft Excel 2007 and initially assessed for normality using the Shapiro-Wilk test. As normal distribution was observed, ANOVA One-WAY using the Tukey post hoc test was used for comparisons between the groups. All data are expressed as mean and standard deviation values. The software program GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used; a significant difference was considered when  $p < 0.05$ .

## Results

### Treadmill running

The WT control mice ran on the treadmill for an average duration of  $40.3 \pm 3.41$  min, at an average speed of 1.6 miles per hour. The *mdx* control group showed clinical signs of exhaustion after running for  $5.6 \pm 0.7$  min, which is 13.89% of the running time of the normal control group (WT), presenting a statistical difference of  $p < 0.001$ . The group that received LLLT remained on the mat for  $9.5 \pm 1.4$  min, which indicated a 69.64% improvement in the time spent before reaching exhaustion compared to *mdx* fatigue group; a statistical difference of  $p < 0.05$  compared with the *mdx* fatigue group was observed (Figure 2).

### Quantitative assessment of muscle histology

Dystrophic *mdx* animals of both the control group and no fatigue with fatigue and *mdx* group treated with LLLT presented with high levels of myofiber necrosis, characterized by inflammatory cell infiltration and degeneration of hypercontracted myofibers with a fragmented sarcoplasm. The control mice (WT) showed normal myofibers with peripheral nuclei intact, as well as non-fragmented nuclei and sarcolemma (Figures 3 and 4).

### Serum CK

The serum CK level at baseline was statistically different between the normal mice ( $2.009 \pm 500$  IU/L) and the *mdx* control group ( $4.154 \pm 1.020$  IU/L) ( $p < 0.05$ ). The group that was subjected to forced exercise (*mdx* fatigue) showed a higher increase in serum CK ( $5.577 \pm 1.821$  IU/L) than the *mdx* controls, whereas mice that were treated with LLLT showed a reduction in CK levels to a value that was almost equal to the baseline value ( $4.076 \pm 1.575$  IU/L). At 24h after the protocol of treadmill running, mice in the *mdx* fatigue group showed a serum CK level of  $5.076 \pm 610.5$  IU/L, i.e., a slight decrease compared with the baseline level, with a statistical difference when compared with the

*mdx* control group ( $p < 0.05$ ). When we analyzed the CK levels of the *mdx* fatigue LLLT group, a marked decrease was observed ( $2.367 \pm 983.8$  IU/L), presenting a statistical difference compared with the *mdx* fatigue group ( $p < 0.001$ ) (Figure 5).

### **Protein carbonyl**

The protein carbonyl level at baseline was  $0.8214 \pm 0.3030$  nmol/mg protein in normal mice compared with  $2.229 \pm 0.6009$  nmol/mg protein in the *mdx* control group, showing a statistical difference ( $p < 0.05$ ). The group that was subjected to forced exercise (*mdx* fatigue) showed a higher level than the *mdx* controls ( $3.134 \pm 0.6223$  nmol/mg protein), whereas animals that were treated with LLLT showed a reduction in carbonyl level ( $2.310 \pm 0.7132$  nmol/mg protein) close to the baseline value (Figure 6 A). Twenty-four hours after performing the protocol of treadmill running, the mice in the *mdx* fatigue group showed a carbonyl level of  $3229 \pm 1214$  nmol/mg protein, with a statistical difference when compared with the mice in the *mdx* control group ( $p < 0.05$ ). In the *mdx* fatigue LLLT group, a marked decrease in the level of carbonyl was observed ( $2.174 \pm 0.6640$  nmol/mg protein), presenting a statistical difference compared with the *mdx* fatigue group ( $p < 0.05$ ) (Figure 6B).

### **Superoxide dismutase**

The SOD level at baseline was  $2.402 \pm 0.2342$  U/mg total protein in normal mice and  $2.988 \pm 0.1763$  U/mg total protein in the *mdx* control group, showing a statistical difference ( $p < 0.05$ ). The group that was subjected to forced exercise (*mdx* fatigue), showed an increase in SOD levels ( $3.540 \pm 0.3725$  U/ mg total protein) compared with the level in the *mdx* control group, whereas animals that were treated with LLLT showed a decrease in SOD level ( $2.552 \pm 0.2422$  U/mg total protein) (Figure 7A). Twenty-four hours after performing the protocol of treadmill running, animals of the *mdx* fatigue group showed an SOD level of  $3.528 \pm 0.3577$  U/mg total protein, with a statistical difference when compared with the *mdx* control group ( $p < 0.05$ ). In the *mdx* fatigue LLLT group, a sharp decrease in SOD level ( $2.534 \pm 0.4167$ ) was observed, presenting a statistical difference compared with the *mdx* fatigue group ( $p < 0.05$ ) (Figure 7B).

## Discussion

The results of this study provide evidence for the beneficial effects of LLLT against oxidative stress in *mdx* mice subjected to high-intensity exercise on a treadmill, leading to remarkable recovery in the levels of CK, protein carbonyl, and SOD, and of functional capacity immediately after the exercise and after 24 h during recovery. Nevertheless, LLLT did not produce an improvement in the muscle morphology of the exercised *mdx* mice, which was in contrast to the strong change in biochemical markers of oxidative stress and muscle damage. One interpretation of this result could be that a three application of LLLT is not sufficient to cause structural changes in muscle morphology, but could cause changes in oxidative stress in exercised mice. Therefore, this study provides further evidence that LLLT could be used for achieving functional recovery of dystrophic muscle in the same way as in healthy individuals, and thereby decrease the impact of muscle fatigue and oxidative stress in patients with muscle dystrophy [20, 21].

It is well established in the literature that *mdx*, possessing a mutation in the dystrophin gene, is a mouse model for DMD. Without dystrophin, there is a loss of neuronal nitric oxide synthase, resulting in a reduction of nitric oxide signaling capacity and decreased stability of the sarcolemma. Sarcolemmal disruption leads to pathological accumulation of intracellular calcium, which may activate apoptosis and necrosis and increase muscle protein degradation [5].

We showed that *mdx* mice, compared to WT mice, have higher levels of protein carbonyl and CK when they are at rest. We also demonstrated that high-intensity physical exercise is able to further increase the levels of carbonyl and CK; this type of exercise has the potential to increase oxidative stress in these animals that previously already have high levels of those markers. Compared with the WT animals, we assert that LLLT was able to mitigate the presence of carbonyls, even after the completion of high-intensity exercises. Our results are in agreement with other studies that reported higher levels of lipid, protein, and DNA oxidative damage in *mdx* mice [5, 7, 26], as well as studies that have shown that LLLT causes changes in levels of oxidative stress markers, muscle damage, and muscle fatigue in healthy subjects [17-20].

In this study, we performed biochemical analysis of SOD. We observed that *mdx* mice had higher levels of SOD than normal mice (WT), and that immediately after high-intensity exercise these levels increased further. On the other hand, animals that received LLLT showed values of SOD comparable to that of the normal control group that did not perform treadmill running. These results were in contrast to those in other reports [5, 27, 28].

According to Kaczor et al. [5], oxidative stress is involved in the pathogenesis of the muscle in *mdx* mice, and this process triggers a cellular response causing a compensatory upregulation of antioxidant defense enzymes. The findings of lower levels of free radical damage markers after LLLT application in *mdx* mice together with a significant increase in antioxidant enzyme activities and protein content imply that LLLT lowered ROS production in this study. Recent studies under normal and pathological conditions in animals have presented results indicating improved cell balancing and attenuation of oxidative stress.

Therefore, our findings suggest that the reduction of oxidative stress is related to skeletal muscle. Furthermore, LLLT delays fatigue and protects against exercise-induced damage as well improves the redox state, since the LLLT-treated *mdx* mice in this study were able to run for longer on the treadmill during the high-intensity exercise; that is, muscle fatigue was delayed in these animals. Moreover, another previous study [10] also suggests that the effects of LLLT include increasing microcirculation, potentially providing anti-inflammatory activity, and improving mitochondrial function.

Although other studies [29, 30] suggest that LLLT could improve muscle tissue repair and minimize muscle structural damage, the present study did show those observations. However, this is perhaps because only a three application of LLLT may not be sufficient in effecting such mechanisms; also, the time of observing the morphological changes in the dystrophic muscle of the animals, which still had large amounts of necrotic tissue and an altered position of internalized myonuclei, may be too short.

In conclusion, oxidative stress markers were significantly higher in the muscle of *mdx* mice than in WT mice, and LLLT was able to reduce these markers even in conditions of muscle fatigue. The activity of the antioxidant enzyme SOD was higher in *mdx* mice than



in WT mice. LLLT also reduced the levels of SOD markers significantly. LLLT had a beneficial effect on the skeletal muscle of *mdx* mice and improved the performance of these animals. However, the three application of LLLT and the dose parameters used were not able cause changes in the morphology of dystrophic muscles.

### ***Acknowledgments***

The authors wish to thank the Brazilian Research Council-CNPq for the support for this study (process no. 472334/2011-5).

### **Competing interests**

Professor Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior receives research support from Multi Radiance Medical (Solon, OH - USA), a laser device manufacturer. Multi Radiance Medical had no role in the planning of this study, and the laser device used was not theirs. They had no influence on study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The remaining authors declare that they have no conflict of interests. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

### **References**

- 1- Turk R, Sterrenburg E, de Meijer EJ, van Ommen GJ, den Dunnen JT, 't Hoen PA. Muscle regeneration in dystrophin-deficient *mdx* mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics*. 2005 Jul 13;6:98.
- 2- Petrof BJ. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002 Nov;81(11 Suppl):S162–74.
- 3- Yin HF, Moulton HM, Betts C, Merritt T, Seow Y, Ashraf S, Wang QS, Boutilier J, Wood MJA. Functional rescue of dystrophin-deficient *mdx* mice by a chimeric peptide-PMO. *Mol Ther*. 2010 October;18(10):1822–1829.
- 4- Andersson DC, Meli AC, Reiken S, Betzenhauser MJ, Umanskaya A, Shiomi T, D'Armiento J, Marks AR. Leaky ryanodine receptors in  $\beta$ -sarcoglycan deficient mice: a potential common defect in muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2012 May 28;2(1):9.

- 5- Kaczor JJ, Hall JE, Payne E, Tarnopolsky MA. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jul 1;43(1):145–54.
- 6- Meadows E, Flynn JM, Klein WH. Myogenin regulates exercise capacity but is dispensable for skeletal muscle regeneration in adult *mdx* mice. *PLoS One*. 2011;6(1):e16184.
- 7- Terrill JR, Radley-Crabb HG, Iwasaki T, Lemckert FA, Arthur PG, Grounds MD. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J*. 2013 Sep;280(17):4149–64.
- 8- Angelini C, Tasca E. Fatigue in muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord*. 2012 Dec;22 Suppl 3:S214–20.
- 9- Koyama H, Nojiri H, Kawakami S, Sunagawa T, Shirasawa T, Shimizu T. Antioxidants improve the phenotypes of dilated cardiomyopathy and muscle fatigue in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Molecules*. 2013 Jan 24;18(2):1383–93.
- 10- De Marchi T, Leal Junior EC, Bortoli C, Tomazoni SS, Lopes-Martins RA, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci*. 2012 Jan;27(1):231–6.
- 11- Domínguez A, Velásquez SA. Effect of low-level laser therapy on pain following activation of orthodontic final archwires: a randomized controlled clinical trial. *Photomed Laser Surg*. 2013 Jan;31(1):36–40.
- 12- Firat ET, Dağ A, Günay A, Kaya B, Karadede MI, Ersöz Kanay B, Ketani A, Evliyaoğlu O, Uysal E. The effect of low-level laser therapy on the healing of hard palate mucosa and the oxidative stress status of rats. *J Oral Pathol Med*. 2013 Aug 19. [Epub ahead of print].
- 13- Dawood MS, Salman SD. Low level diode laser accelerates wound healing. *Lasers Med Sci*. 2013 May;28(3):941–5
- 14- Alves AC, Albertini R, Dos Santos SA, Leal-Junior EC, Santana E, Serra AJ, Silva JA Jr, de Carvalho PD. Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen

- types I and III in a papain cartilage injury model. *Lasers Med Sci.* 2013 Aug 29. [Epub ahead of print].
- 15-Alves AC, Vieira RD, Leal-Junior EC, Dos Santos SA, Ligeiro AP, Albertini R, Junior JA, de Carvalho PD. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2013 Sep 12;15(5):R116.
- 16-Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci.* 2013 Sep;28(5):1305–13.
- 17-Sussai DA, Carvalho Pde T, Dourado DM, Belchior AC, dos Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci.* 2010 Jan;25(1):115–20.
- 18-Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, de Almeida P, Ramos L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2010 Apr;108(6):1083–8.
- 19-de Almeida P, Lopes-Martins RÁ, Tomazoni SS, Silva JA Jr, de Carvalho Pde T, Bjordal JM, Leal Junior EC. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. *Photochem Photobiol.* 2011 Sep-Oct;87(5):1159-63.
- 20-Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Rossi RP, De Marchi T, Baroni BM, de Godoi V, Marcos RL, Ramos L, Bjordal JM. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers Surg Med.* 2009 Oct;41(8):572–7.
- 21-de Almeida P, Lopes-Martins RA, De Marchi T, Tomazoni SS, Albertini R, Corrêa JC, Rossi RP, Machado GP, da Silva DP, Bjordal JM, Leal Junior EC. Red (660 nm) and infrared (830 nm) low-level laser therapy in skeletal muscle fatigue in humans: what is better? *Lasers Med Sci.* 2012 Mar;27(2):453–8.
- 22-Jorge TCA, Catro SL. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p.

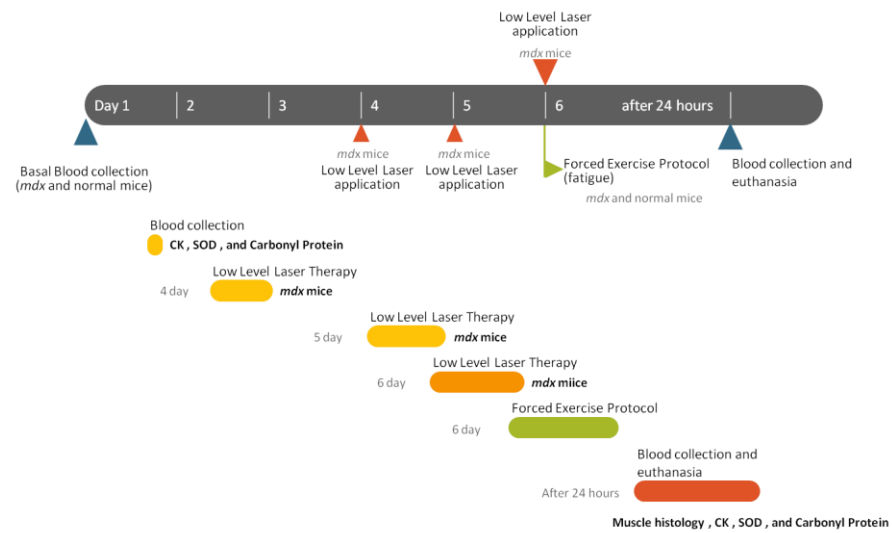
- 23-Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84(1):209–38.
- 24-Liu XG, Zhou YJ, Liu TC, Yuan JQ. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed Laser Surg.* 2009 Dec;27(6):863–9.
- 25-Granchelli JA, Pollina C, Hudecki MS. Pre-clinical screening of drugs using the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* 2000;10:235–9.
- 26-Cozzoli A, Nico B, Sblendorio VT, Capogrosso RF, Dinardo MM, Longo V, Gagliardi S, Montagnani M, De Luca A. Enalapril treatment discloses an early role of angiotensin II in inflammation- and oxidative stress-related muscle damage in dystrophic mdx mice. *Pharmacol Res.* 2011 Nov;64(5):482–92.
- 27-Ragusa RJ, Chow CK, Porter JD. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1997;7:379–86.
- 28-Disatnik MH, Dhawan J, Yu Y, Beal MF, Whirl MM, Franco AA, Rando TA. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci.* 1998;161:77–84.
- 29-Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* 2009 Sep;94(9):1005–15.
- 30-Leal-Junior EC, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho PD, Dal Corso S, Bjordal JM. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2013 Nov 19. [Epub ahead of print].
- 31-Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63.

## Tables

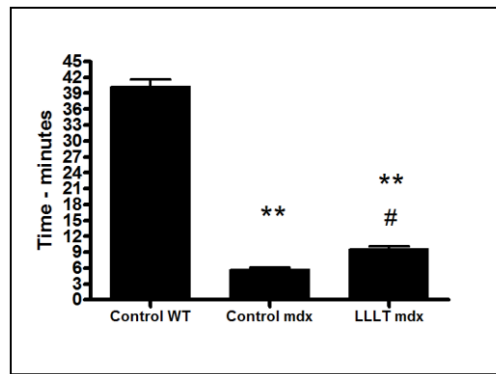
Table 1. Summary of the laser parameters.

Wave length (nm)	Output power (mW)	Power density (W/cm <sup>2</sup> )	Laser beam (cm <sup>2</sup> )	Energy density (J/cm <sup>2</sup> )	Energy per point (J)	Irradiation time per point (sec)	Total energy delivered over treatments (J)
808	30	1.071	0.028	107	3	100	9

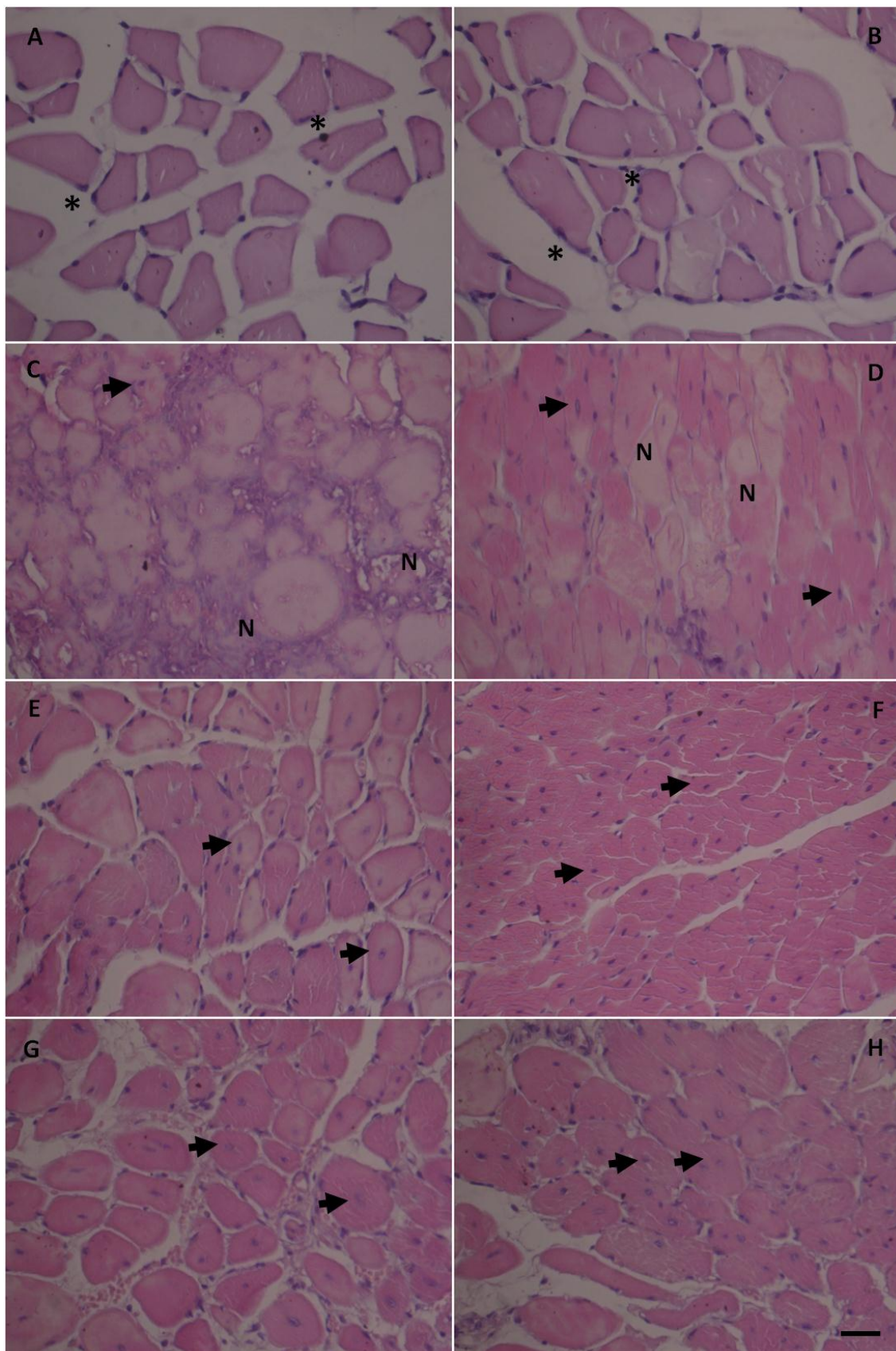
## Legends of figures



**Figure 1.** Flowchart of experimental design and distribution of the groups.

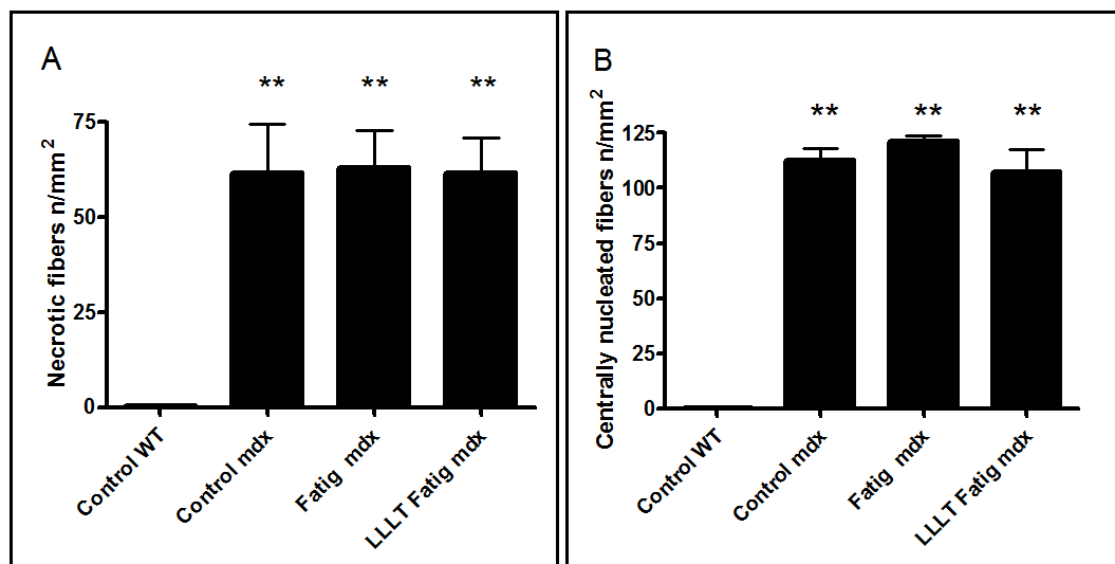


**Figure 2.** Comparative analysis of the effect of treadmill running between the control (WT), *mdx* control, *mdx* fatigue, and *mdx* fatigue with low-level laser therapy (LLLT) groups. \*\*,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the control (WT) group. #,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with control *mdx*. Results are expressed mean ( $\pm$  standard deviation) values.

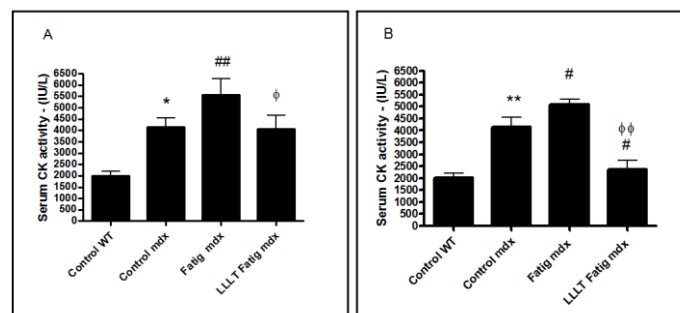


**Figure 3.** Representative gastrocnemius skeletal muscle sections stained with

hematoxylin-eosin from wild type and mdx mice. In (A and B) no apparent morphological changes can be observed in control wild type (wt) mice, note the positioning of nuclei present that within the normal limits (Asterisco). In (C and D) Large necrotic areas can be observed in control mdx mice (N), note the positioning of nuclei have centralized that displaced (arrowhead). In (E and F) observed in mdx mice fatigue at all points in time examined, note the immature fibers central nuclei, cytoplasm rounded shape (arrowhead). In (G and H) observed in LLLT fatigue mdx mice, note the immature fibers central nuclei, cytoplasm rounded shape (arrowhead). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

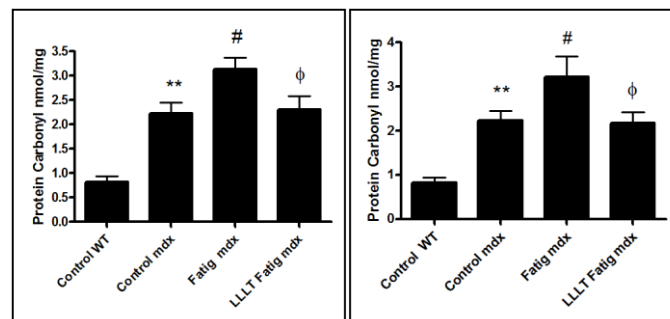


**Figure 4.** Effect of low-level laser therapy (LLLT) on muscle damage. (A) Number of necrotic fibers per area. (B) Number of internalized myonuclei per muscle fiber area ( $\text{no./mm}^2$ ). \*\*,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the control (WT) group. Results are expressed mean ( $\pm$  standard deviation) values.

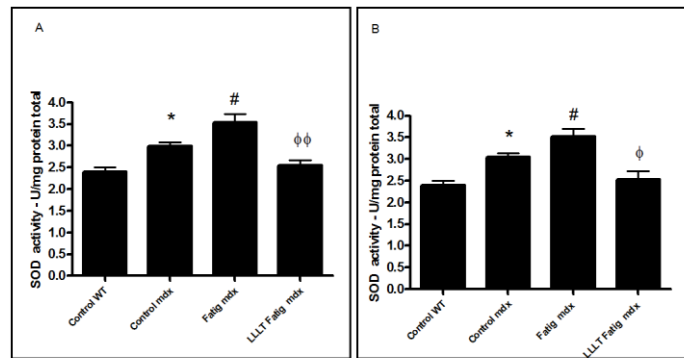




**Figure 5.** Comparison of mean  $\pm$  standard deviation values of level of creatine kinase (CK) between groups (treated with LLLT and untreated). (A) CK levels after the completion of high-intensity exercise. \*,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the control (WT) group. ##,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the *mdx* control group.  $\phi$ ,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the *mdx* fatigue group. (B) CK levels 24 h after the completion of high-intensity exercise. \*\*,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the control (WT) group. #,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the *mdx* control group.  $\phi$ ,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the *mdx* fatigue group. Results are expressed the mean ( $\pm$  standard deviation) values.



**Figure 6.** Comparison of protein carbonyl level between groups (treated with LLLT and untreated). (A) Values of protein carbonyl immediately after the completion of high-intensity exercise. \*\*,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the control (WT) group. #,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the *mdx* control group.  $\phi$ ,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the *mdx* fatigue group. (B) Protein carbonyl values 24 h after the completion of high-intensity exercise. \*\*,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the control (WT) group. #,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the *mdx* control group.  $\phi$ ,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the *mdx* fatigue group. Results are expressed the mean ( $\pm$  standard deviation) values.



**Figure 7.** Comparison of superoxide dismutase (SOD) level between groups (treated with LLLT and untreated). (A) Values of SOD immediately after the completion of high-intensity exercise. \*,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the control (WT) group. ##,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the *mdx* control group. φφ,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the *mdx* fatigue group. (B) Values of SOD 24 h after completion of the high-intensity exercise.  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the control (WT) group. #,  $p < 0.05$ , Tukey test compared with the *mdx* control group. φφ,  $p < 0.001$ , Tukey test compared with the *mdx* fatigue group. Results are expressed mean ( $\pm$  standard deviation) values.

## 5. Discussão

Os resultados deste estudo fornecem dados para os efeitos benéficos da LLLT nos camundongos *mdx* submetidos ao exercício de alta intensidade em esteira, levando à recuperação dos marcadores bioquímicos analisados e da capacidade funcional avaliada imediatamente após o exercício e após 24hs durante a recuperação. No entanto, a LLLT não foi capaz de produzir melhoria na morfologia das fibras musculares dos camundogs *mdx*, no qual se apresenta em contraste com a forte alteração dos marcadores bioquímicos. A interpretação desses resultados tem como base que a aplicação do laser não foi suficiente para provocar mudanças estruturais na morfologia muscular, na qual o camungongo *mdx* já apresentava alterações nestas fibras, mas foi capaz de alterar os parametros bioquímicos dos camundongos submetidos ao exercício. Portanto, este estudo fornece evidência adicional de que LLLT pode ser usado para atingir a recuperação funcional do músculo distrófico da mesma maneira como em indivíduos saudáveis, diminuindo a incidência de fadiga muscular e do estresse oxidativo em pacientes com DMD Leal Junior et al. 2010 e Almeida 2012.

A literatura descreve de maneira clara que o camundogo *mdx*, possui uma mutação no gene da distrofina, sendo utilizado como experimental para a DMD. A ausência da distrofina ocorre uma perda de óxido nítrico neuronal, resultando em uma redução da capacidade de sinalização de óxido nítrico e de estabilidade do sarcolema. As alterações no sarcolema leva ao acumulo cálcio intracelular, que pode activar a apoptose e necrose, aumentando a degradação da proteína muscular Kaczor et al. 2007.

Neste trabalho é demonstrado que camundongos *mdx*, em comparação com camundongos C57balck10, apresentam níveis mais elevados de proteína carbonila e CK quando estão em repouso e o exercício físico de alta intensidade é capaz de aumentar ainda mais os níveis de carbonila e CK, este tipo de exercício tem o potencial de aumentar o estresse oxidativo nestes animais que anteriormente já apresentava altos níveis desses marcadores. Em comparação com os animais camundongos C57balck 10, demostramos que LLLT foi capaz

de atenuar a presença das carbonilas, mesmo após a realização de exercícios de alta intensidade. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que relataram níveis mais elevados de lipídios, proteínas e danos no DNA em camundongos *mdx* (Kaczor et al. 2007, Terril et al. 2013, Cozzoli et al 2011), bem como estudos que demonstraram que a LLLT provoca alterações nos marcadores de estresse oxidativo, lesões musculares e fadiga muscular em indivíduos saudáveis (Sussai et al. 2010, Leal-Junior et al. 2009), acreditamos também que o LLLT tenha influenciado diretamente o aumento da produção do ATP, pela ressíntese de fosfocreatina, resultando na diminuição da CK no camundongos *mdx* tratados (Ferraresi et al. 2012).

Na análise bioquímica da SOD, observou-se que camundongos *mdx* apresentaram maiores níveis de SOD do que os camundongos C57balck 10, e que imediatamente após o exercício de alta intensidade estes níveis aumentaram ainda mais. Por outro lado, os animais que receberam a LLLT mostraram valores de SOD comparáveis ao do grupo controle normal que não foram submetidos ao exercício de alta intensidade, estes resultados diferem dos estudos Kaczor et al. 2007, Terril et al. 2013 e Disatnik 1998.

O estresse oxidativo que está envolvido nos camundongos *mdx* desencadeia uma regulação positiva na produção das enzimas antioxidantes (Kaczor 2007), os marcadores de dano muscular apresentaram uma diminuição após a aplicação da LLLT e o aumento significativo da atividade das enzimas oxidantes implica que o LBP foi capaz de reduzir a produção de EROs neste estudos recentes em animais que apresentavam condições normais e patológicas os resultados indicam, melhor equilíbrio celular e atenuação do estresse oxidativo, os resultados deste trabalho sugere que a redução do estresse oxidativo está relacionada com o músculo esquelético. Além disso, o LLLT foi capaz de retarda a fadiga muscular e proteger as células contra danos induzidos pelo exercício, já que os camundongos *mdx* tratados foram capazes de correr por mais tempo na esteira durante o exercício de alta intensidade, ou seja, a fadiga muscular foi atenuada nestes animais. Outro estudo (De Marchi et al. 2012), também sugere que os efeitos da LLLT incluem o aumento da microcirculação, atividade anti-inflamatória, melhoria da função mitocondrial.

Embora outros estudos (Nakano et al. 2009 e Leal-Junior 2013) sugerem que a LLLT pode melhorar o reparo do tecido muscular e minimizar danos estruturais, o presente estudo não mostra essas observações. No entanto, seja porque a aplicação de LLLT pode não ser suficiente para efetuar tais mecanismos, ou o tempo de observação não tenha sido suficiente a para iniciar um processo de regeneração ou degeneração no músculo distrófico, que ainda apresentavam grande quantidade de tecido necrótico e alterações morfológicas das fibras musculares.

## 6. Conclusão.

Em conclusão observamos que os marcadores de estresse oxidativo nos camundongos *mdx*, foram significativamente mais elevados quando comparado com os camundongos C57Black10. A enzima sódio dismutase apresentou-se significativamente mais elevada nos camundongos *mdx* em comparação com os camundongos C57Black10.

A LLLT foi capaz de reduzir os marcadores de estresse oxidativo em camundongos *mdx*, mesmo submetidos ao exercício alta intensidade. A LLLT também apresentou um efeito benéfico sobre o músculo esquelético, melhorando o desempenho dos animais distróficos.

No entanto, a LLLT e os parâmetros de doses utilizadas não foram capazes promoverem as alterações na morfologia das fibras musculares distróficas.

## 7. Referências Bibliográficas.

Andersson D.C.; Meli A.C.; Reiken S.; Betzenhauser M.J.; Umanskaya A.; Shiomi T.; D'Armiento J.; Marks A.R.; Leaky ryanodine receptors in  $\beta$ -sarcoglycan deficient mice: a potential common defect in muscular dystrophy. **Skelet Muscle**. May 28, n.2, p.1-9, 2012.

Asai A.; Sahani N.; Kaneki M.; Ouchi Y.; Martyn J.A.; Yasuhara S.E.; Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy. **PLoS ONE**. v.2, n.8, p.806, 2007.

Avni D.; Levkovitz S.; Maltz L.; Oron U.; Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. **Photomed Laser Surg**. n.23, v.3, p.273–277, 2005.

Blake D.J.; Weir A.; Newey S.E.; Davies K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiol Rev**. n.82, v.2, p.291-329, 2002.

Bulfield G.; Siller W.G.; Wight P.A.; Moore K.J.; X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci**. n.81, v.4, p.1189-1192, 1984.

Collins C. A. I.; Olsen P.S.; Zammit L.; Heslop A.; Petrie T. A.; Partridge J. E.; Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell**. v.122, p.289–301, 2005.

Cotton AM. A review of the principles and use of lasers in lower limb problems. **Int J Low Extrem Wounds**. v3, n3, p133-42, 2004.

Cullen M. J.; & Mastaglia F. L.; Morphological changes in dystrophic muscle. **Br Med Bull**, v.36, n.2, p.145-22. 1980.

Dangain J.; & Vrbova G.; Muscle development in mdx mutant mice. **Muscle Nerve**. n.7, p.700–704, 1984.

Dalle-Donne I.; Rossi R.; Colombo R.; Giustarini D.; Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin Chem**, n. 52, v.4, p.601-23, 2006.

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

Disatnik M. H.; Dhawan J.; Yu Y.; Beal M. F.; Whirl M. M.; Franco A. A.; Rando T. A.; Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. **J Neurol Sci**. n.161, p.77–84, 1998.

Fernandes K. P.; Alves A. N.; Nunes F. D.; Souza N. H.; Silva J. A. Jr.; Bussadori S. K.; Ferrari R.A.; Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 $\beta$  in skeletal muscle following acute injury. **Lasers Med Sci**. v.28, n.3, p.1043-6, 2013.

Ferraresi C.; Hamblin M.R.; Parizotto N.A.; Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. **Photonics Lasers Med**. v.1, n.4, p.267-286, 2012.

França C. M.; de Loura S. C.; Takahashi C. B.; Alves A. N.; De Souza Mernick A. P.; Fernandes K. P.; de Fátima Teixeira da Silva D.; Bussadori S. K.; Mesquita-Ferrari R. A.; Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats. **Lasers Med Sci**. v. 28, n.5, 1331-1338, 2013.



Fluck M.; Hoppeler H.; Molecular basis of skeletal muscle plasticity—from gene to form and function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** n.146, p.159-216, 2003.

Fukushima K.; Badlani N.; Usas A.; Riano F.; Fu F.; Huard J.; The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. **Am J Sports Med.** v.29, n.4, p.394-402, 2001.

Giustarini D.; Dalle-Donne I.; Tsikas D.; Rossi R.; Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Crit Rev Clin Lab Sci.** n. 46, v.5-6, p. 241-281, 2009.

Gutteridge John M. C.; Halliwell Barry; Antioxidants: Molecules, medicines, and myths, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.393, n.4, p. 561-564, 2010.

Gundersen K.; Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. **Biol Rev Camb Philos Soc.** v.86, p.564–600, 2010.

Haslett J. N.; Kang P. B.; et al. The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. **Mamm Genome**, v.16, n.10, p.739-48, 2005.

Hayes A. & Williams D. A.; Contractile properties of clenbuterol-treated mdx muscle are enhanced by low-intensity swimming. **J Appl Physiol.** v.82, n.2, p.435-439, 1997.

Hauser E.; Hoyer H.; Bittner R.; Widhalm K.; Herkner K.; Lubec G.; Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. **Neuropediatrics** v.26, p.260–262, 1995.

Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. **Phys Med Biol.** v. 7, n=58, p37-61. 2013.

Jackson M. J.; Jones D. A.; Edwards R. H.; Techniques for studying free radical damage in muscular dystrophy. **Med Biol.** n.62, p.135–138, 1984.

Joshua T.; et al. Increased catalase expression improves muscle function in *mdx* mice. **Exp Physiol.** n.96, v.2, p.194–202, 2010.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B.** v.49, n.1, p.1–17,1999.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.** May;56(5), p.691-704. 1989.

Kaczor J. J.; Hall J.E.; Payne E.; Tarnopolsky M. A.; Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of *mdx* mice. **Free Radic Biol Med.** n.43, p.145–154, 2007.

Koyama T.; Tawa M.; Yamagishi N.; Tsubota A.; Sawano T.; Ohkita M.; Matsumura Y.; Role of superoxide production in post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts. **Eur J Pharmacol.** v.5, p.36-41, 2013.

Lagrotta-Candido, J & R. Vasconcellos, et al. Resolution of skeletal muscle inflammation in *mdx* dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production. **Int J Exp Pathol**, v.83, n.3, p.121-32, 2002.

Leal Junior E. C.; Lopes-Martins R. A.; Dalan F.; Ferrari M.; Sbabo F. M.; Generosi R. A.; et al. Effect of 655-nm low-level laser therapy (LLLT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Photomed Laser Surg** v.26, p.419-424, 2008.

Leal Junior E. C.; Lopes-Martins R. A.; de Almeida P.; Ramos L.; Iversen V. V.; Bjordal J. M.; Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **Eur J Appl Physiol.** v.108, n.6, p.1083–1088, 2010.

Leal Junior E. C.; Lopes-Martins R. A.; Vanin A. A.; Baroni B. M.; Grosselli D.; De Marchi T.; et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy (LLLT) in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Lasers Med Sci.** n.24, p. 425-431. 2009.

Lee J .S.; Pfund Z.; Juhász C.; Behen M. E.; Muzik O.; Chugani D. C.; Nigro M. A.; Chugani H. T.; Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. **Muscle Nerve.** v.26, n.4, p.506-512, 2002.

Lopes-Martins R .A .; Marcos R. L.; Leonardo P. S.; Effect of low level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol.** v.101, n.1, p.283–288, 2006.

Lim L. E.; Campbell K. P.; The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. **Curr Opin Neurol.** n.11, v.5, p.443-52.1998.

Lubart R.; Eichler M.; Lavi R.; Friedman H.; Shainberg A.; Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. **Photomed Laser Surg.** v.23, n.1, p.3, 2005.

Marks D. B., Marks A. D., Smith C. M.; Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, Lippincott Williams & Wilkins, acp 21, p327-340, 1996.

Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol.** n.9, p.493–495, 1961.

Mcdouall, R. M., M. J. Dunn, et al. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. **J Neurol Sci.** v.99, n.2-3, Nov, p.199-217. 1990.

Mechler F, Imre S & Dioszeghy P.; Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. **J Neurol Sci.** n.63, p.279–283, 1984.

Meadows E.; Flynn J.M, Klein W.H.; Myogenin regulates exercise capacity but is dispensable for skeletal muscle regeneration in adult *mdx* mice. **PLoS One.** n.6, v.1, p.161-184, 2011.

Michele, D.E. & Campbell K.P.; Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. **J Biol Chem**, v.278, n.18, May 2, p.15457-60, 2003.

Miyazaki M.; Esser K. A.; Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. **J Appl Physiol.** v.106, p.1367–1373, 2009.

Nowak K.J. & Davies K.E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **EMBO Rep.** n.5, p.872–876. 2004.

Pastoret C & Sebille A.; Further aspects of muscular dystrophy in *mdx* mice. **Neuromuscul Disord** v.3, p.471-475, 1993.

Pastoret C & Sebille A.; *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **J Neurol Sci.** v.129, p.97-105, 1995.

Pastoret C & Sebille A.; Age-related differences in regeneration of dystrophic (*mdx*) and normal muscle in the mouse. **Muscle Nerve.** v.18, n.10, p.1147-1154, 1995.

Pattwell D. M.; McArdle A.; Morgan J. E.; Patridge T. A.; Jackson M. J.; Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n.7, p.1064-72, 2004.

Ragusa R. J.; Chow C. K.; Porter J. D.; Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**. v.7, n.6-7, p379-386, 1997.

Rahimov F. & Kunkel L.M. The cell biology of disease: Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. **J Cell Biol**. v.13, n4, p.499-510. 2013.

Rando T.A.; Disatnik M.H.; Yu Y.; Franco A. Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. **Neuromuscul Disord**. v.8, n.1, p.14-21, 1998.

Rennó A. C.; Toma R. L.; Feitosa S. M.; Fernandes K.; Bossini P. S.; de Oliveira P.; Parizotto N.; Ribeiro D. A.; Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg**. n.29, v.1, p.5-10, 2011.

Rizzi C. F.; Mauriz J. L.; Freitas Correa D. S. et al.; Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers Surg Med**. v.38, n.7, p704–713, 2006.

Robertson, J. D.; Maughan R. J.; Duthie G. G.; Morrice P. C.; Increase blood antioxidant systems of runners in response to training load. **Clin. Sci**. n.80, p.611-618, 2005.

Schiaffino S.; Sandri M.; Murgia M.; Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. **Physiology**. n.22, p.269–278, 2007.

Sicinski, P. Y.; Geng, et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. **Science**, v.244, n.4912, p.1578-80, 1989.

Silva J. P.; da Silva M. A.; Almeida A. P.; Lombardi Junior I.; Matos A. P.; Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. **Photomed Laser Surg.** N.28, v.1, 17-21, 2010.

Silva L. H.; Silva M. T.; Gutierrez R. M.; Conte T. C.; Toledo C. A.; Aoki M. S.; Liebano R. E.; Miyabara E. H.; GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. **Lasers Med Sci.** v.27, n.5, p.993-1000, 2012.

Silveira P. C.; da Silva L. A.; Pinho C. A.; De Souza P. S.; Ronsani M. M.; Scheffer D. L.; Pinho R. A.; Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. **Lasers Med Sci.** v.28, n.2, p.431-6, 2013.

Smith, J. e P. N. Schofield. The effects of fibroblast growth factors in long-term primary culture of dystrophic (mdx) mouse muscle myoblasts. **Exp Cell Res**, v.210, n.1, Jan, p.86-93, 1994.

Spangenburg E. E.; Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. **Appl Physiol Nutr Metab**, n.34, p.328–335, 2009.

Spencer, M. J.; C. M. Walsh.; et al. Myonuclear apoptosis in dystrophic *mdx* muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. **J Clin Invest.** v.99, n.11, Jun 1, p.2745-51, 1997.

Straub V. & Campbell K.P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. **Curr Opin Neurol** v.10, p.168–175, 1997.

Strober J.B. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. **Neuro Rx.** v.3, n.2 p.225-234, 2006.

Sussai D. A.; Carvalho P. de T.; Dourado D. M.; Belchior A. C.; dos Reis F. A.; Pereira D. M.; Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. **Lasers Med Sci.** Jan;25(1), p.115-20, 2010.

Terrill J. R.; Radley-Crabb H. G.; Grounds M. D.; Arthur P. G.; N-Acetylcysteine treatment of dystrophic mdx mice results in protein thiol modifications and inhibition of exercise induced myofibre necrosis. **Neuromuscul Disord.** v. 22, n. 5, p.427-34, 2012.

Viola H. M. & Hool L. C. Qo site of mitochondrial complex III is the source of increased superoxide after transient exposure to hydrogen peroxide. **J Mol Cell Cardiol** n.49, p.875–885, 2010.

Watchko J. F.; O'Day T. L.; Hoffman E. P.; Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. **J Appl Physiol.** n.93, v.2, p.407-417, 2002.

Yin H.; Price F.; Rudnicki M. A.; Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiol Rev.** n.93, v.1, p.23-67, 2013.

## 8. Anexos





**Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA -- UNINOVE**  
 Av. Francisco Matarazzo, 612 - Prédio C -- Térreo  
[ceua@uninove.br](mailto:ceua@uninove.br)

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº número da folha de rosto AN 0023\_2011

**Título do Projeto:** Estudo da Ação do Laser de Baixa Potência na expressão gênica da MyoD e Apoptose Celular no Músculo Gastrocnêmio de Camundongos MDx Submetidos a Exercício de Natação Resistido.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho

**Aluno:** Andréia Aparecida De Oliveira Silva

**Objetivos:** O presente projeto tem por objetivo avaliar a expressão gênica da MyoD e Apoptose Celular no Músculo Gastrocnêmio de Camundongos MDx Submetidos a Exercício de Natação Resistido e posteriormente tratados com laser de baixa potência.

**Método:** Para compor os grupos experimentais do projeto foi realizado um cálculo amostral com base nos estudos de Stupka *et al*, (2004) e Binkhorts *et al*, (1989), considerando a aplicação do teste estatístico ANOVA para 3 tratamentos, com poder de teste de 80 e nível alfa de 0,05 resultando em uma amostra mínima de 48 animais, sendo 08 por grupo. Serão formados dois grupos, um de camundongos normais (grupo controle – C) e outro de camundongos MDx (grupo MDx – M), sendo que cada grupo será distribuído seis subgrupos com oito camundongos cada:

- 1-Subgrupo (n=8) Animais normais em repouso;
- 2-Subgrupo (n=8) Animais normais submetidos ao exercício de alta intensidade;
- 3-Subgrupo (n=8) Animais normais submetidos ao exercício com aplicação de Laser de Baixa Potência;
- 4-Subgrupo (n=8) Animais MDx em repouso;
- 5-Subgrupo (n=8) Animais MDx submetidos ao exercício de alta intensidade.
- 6-Subgrupo (n=8) Animais MDx submetidos ao exercício com aplicação de Laser de Baixa Potência.

#### **Protocolo de Natação forçada**

Os animais serão colocados em tanques de superfície lisa com aproximadamente 120 cm de profundidade e 60 cm de diâmetro (Marangon *et al*, 2002), com água mantida a 25°C de temperatura. Serão utilizados 8 tanques (um animal por tanque) para que cada animal nade simultaneamente, sem interferências externas. A carga imposta para cada animal corresponderá a 8% do seu peso corporal, os anéis de chumbo serão fixados em suas caudas, com o auxílio de esparadrapo. O dano muscular será observado pela de perda de movimentos coordenados e submersão durante 10 segundos, determinando assim a exaustão conforme descrito por (Dupont-Versteegden *et al*, 1994).

#### **. Aplicação do laser**

O laser utilizado será o Arsenieto de Gálio de Alumínio (AsGaAl) da marca DMC® modelo Photon Laser III, com potência de 100mW (densidade de potência de 3,57 W/cm<sup>2</sup>), área do feixe de 0,028cm<sup>2</sup>, e comprimento de onda de  $\lambda$  808nm. A aplicação será sob forma de um único ponto pelo método transcutâneo na região posterior sobre o músculo gastrocnêmio, com densidade de energia de 4J com duração de 40 segundos esta dose foi escolhida com base nos estudos descritos por Arruda *et al*, 2010.

**Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):** A amostra será composta por 48 camundongos sendo, 24 camundongos normais da linhagem C57BL/10 6 e 24 da linhagem mutante C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J com dois meses de idade, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), localizado em Manguinhos, Rio de Janeiro, e mantidos no biotério da UNINOVE/Unidade Vergueiro. Os animais permaneceram por um período de cerca de 30 dias para adaptação ao biotério da Uninove e serão utilizados quando completarem três meses de idade onde no qual este período representa melhor a patologia (Abmayr *et al*, 2004; Blake *et al*, 2002; Charge e Rudnicki *et al* 2004).

#### **De acordo**

**Condições de alojamento e nutrição:** As acomodações serão realizadas em caixa de polipropileno tamanho 20x30x13 autoclavável, com tampa em arame galvanizado e bebedouro de 250mL em polipropileno, rolha e

bico reto de 8 cm em aço inoxidável, receberam ração peletizada e água "ad libitum", mantidos em fotoperíodo de 12 horas, temperatura controlada por ar condicionado e ruídos mínimos. Todos os procedimentos experimentais serão realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e do comitê de ética em pesquisa da Universidade Nove de Julho – UNINOVE.

**De acordo**

**Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:**

**Não há, na verdade o stress é um fator que será avaliado.**

**Procedimento Anestésico e/ou Analgésico(incluir dose e vias de administração): Não há**

**Eutanásia:** Decorridas às 24 horas após a aplicação do laser os animais serão submetidos a eutanásia por inalação de Dióxido de Carbono – CO<sub>2</sub>. A câmara será preenchida com cerca de 70% a 80% de CO<sub>2</sub>. Os animais serão conduzidos individualmente até a câmara e colocados imediatamente em contato com a presença do gás, para perda rápida da consciência e hipóxia atribuída à depressão dos centros vitais (Lapchik *et al*, 2009)

**De acordo.**

**Pertinência e valor científico do estudo proposto:** Os dados da literatura encontrados até o momento não elucidam se o exercício realmente contribui para a aceleração ou diminuição do processo degenerativo muscular em portadores da distrofia muscular, sendo assim na prática clínica nenhum método é adotado. Estudos em animais portadores da distrofia muscular são controversos quanto à relação dos exercícios físicos.

A utilização da laserterapia pode ser uma alternativa de redução para os efeitos deletérios do dano muscular causado pelo exercício de alta intensidade em portadores de distrofia muscular.

Destá maneira, o presente projeto pretende estabelecer com a prática fisioterapêutica, se os exercícios físicos associados ou não a laserterapia podem de alguma maneira contribuir para a melhora da arquitetura muscular dos camundongos com Mdx.

**De acordo**

**Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:**

( X ) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

( ) Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

Na aplicação do laser o animal não sentirá dor? Poderia ser feita uma analgesia se necessário?

( ) Não-Aprovado

**São Paulo, 15 de junho de 2011.**



**Prof. Dra. Maria Antonietta Leitão Zajac**  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da  
Universidade Nove de Julho