Luciano Ramos

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR ESTIRAMENTO MUSCULAR
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biomédicas.

São Paulo
2009

Luciano Ramos

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR ESTIRAMENTO MUSCULAR
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biomédicas.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes-Martins

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ramos, Luciano.

Efeito do laser de baixa potência no processo inflamatório induzido por estiramento muscular em ratos / Luciano Ramos. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Inflamação e terapêutica experimental.

Versão do título para o inglês: Effects of low power laser in inflammatory process stretching muscles induced in rats.

Descritores: 1. Alongamento passivo 2. Lesão muscular 3. Inflamação 4. Laser de baixa potência I. Martins, Rodrigo Álvaro Brandão Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0237/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciano Ramos.

Título da Tese: Efeito do laser de baixa potência no processo inflamatório induzido por estiramento muscular em ratos .

Orientador(a): Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Sáles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP: 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - Telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **115** nas fls. **37** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, Coordenador(a) da Linha de pesquisa ***"Efeito do laser de baixa potência no processo inflamatório induzido por exercício excêntrico em ratos"*** do qual participou(aram) o(s) alunos **Luciano Ramos, Rodrigo Labat Marcos, Livia Terezinha Pimentel Branco e o pesquisador Lúcio Frigo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.10.2006**.

São Paulo, 18 de outubro de 2006.

Prof. Dr. UIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA - ICB/USP

A **Tatiana**, meu grande amor, pela paciência, compreensão, pelo apoio nesse momento e por sua ajuda. Por seu amor incondicional nos momentos em que estive distante.

Aos meus pais que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, agradeço pelos dons da ciência, fortaleza, paciência, entendimento que se fizeram necessários durante toda essa minha jornada acadêmica.

A meu orientador, **Doutor Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins**, pela paciência, oportunidade e confiança em meu trabalho e por meu crescimento não só científico, mas também pessoal.

Aos **Doutores Lúcio e Sócrates**, pela assessoria na parte científica e também pela suas amizades.

As técnicas **Simone Teixeira e Patrícia Almeida**, pela ajuda nos dias de bancada.

Aos colegas, que me auxiliaram no desenvolvimento desta tese e pelas noites não durmidas e sim solidárias: **Rodrigo Labat Marcos, Rodney Capp Pallotta**.

Aos novos colegas, mesmo pelo pouco tempo de convivência contribuíram para o desenvolvimento dessa tese: **Rafael Paolo Rossi, Vanessa Godoi, Maria Carla Petrellis, Rodrigo Carvalho**.

A secretária da Pós Graduação em Farmacologia: **Selma Regina Malagueta Rigonati** e a secretária do Departamento de Farmacologia: **Julieta Aparecida Gomes dos Santos**.

A bibliotecária do ICB I: **Sra. Maria José**, por toda atenção e orientação metodológica.

“ Não se pode ensinar alguma coisa a alguém, pode-se apenas auxiliá-lo a descobrir por si mesmo” (GALILEU).

RESUMO

RAMOS, LUCIANO. **Efeito do Laser de Baixa Potência no processo inflamatório induzido por estiramento muscular em ratos.** 156 f. Tese – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Introdução: Estiramento muscular e outras desordens músculo esqueléticas são as principais causas de afastamento do trabalho e estão entre as lesões mais comuns que desabilitam os atletas. O objetivo do presente estudo foi de investigar os efeitos da Terapia Laser de Baixa Intensidade (infravermelha, 810nm) no estiramento do músculo esquelético induzido em ratos. **Métodos:** Ratos wistar machos foram anestesiados para a indução do estiramento muscular. O animal foi posicionado, em decúbito dorsal, sobre cortiça acoplada ao sistema de alongamento. O membro posterior direito foi firmemente preso com linha, que passa por uma roldana e se prende a um peso correspondente a 150% do peso corporal do animal. Esta linha foi fixada sobre o dorso da pata do animal, realizando uma flexão plantar, alongando o músculo tibial anterior da pata posterior direita do animal. O protocolo foi realizado uma única vez sendo que o animal recebeu a tração durante 20 minutos, descansou por 3 minutos e recebeu mais uma tração durante 20 minutos. Os grupos tratados receberam a irradiação do Laser no local da indução, 1 hora após a lesão, para analisar o índice funcional, estudo eletrofisiológico, a proteína C reativa, o extravasamento plasmático, expressão gênica por *real time RT-PCR* e proteica por *Western-Blott* de COX-1 e COX-2, TNF- α , IL 1, IL 6, IL 10 e histologia. **Resultados e Discussão:** A utilização da Terapia Laser de Baixa potência reduziu a inflamação e o dano muscular após o estiramento experimental, conduzindo a uma melhora significativa da atividade de caminhar.

Palavras-chave: Alongamento passivo. Lesão muscular. Inflamação. Laser de Baixa Potência.

ABSTRACT

RAMOS, LUCIANO. **Effects of Low Power Laser in inflammatory process stretching muscles induced in rats.** 156 p. Thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Introduction: Muscle strains and other musculoskeletal disorders are a leading cause of work absenteeism and are among the most common and often disabling injuries in athletes. The main objective of this study was to investigate the effects of low level laser therapy (infrared, 810nm) on controlled muscle strain in rats.

Method: Male wistar rats were anesthetized for controlled muscle strain induction. After one hour the rats were treated with low level laser therapy to analyze the functional index, eletrofisiologic study, reactive c protein, plasmatic extravasation, real time RT-PCR gene expression and western blott analisis of COX-1, COX-2, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 and histology. **Results and Discussion:** After experimental induction of muscle strech, Low Level Laser Therapy was effective reducing inflammation and muscle damage, conducting a better walking activity.

Key words: Passive stretch. Muscle injury. Inflammation. Low Level Laser.

LISTA DE ABREVIações

PMNs – Polimorfonucleares

PAF - Fator de Ativação Plaquetária

IL-1 – Interleucina 1

TNF – Fator de Necrose Tumoral

MIP-1 – Proteínas Inflamatórias

COX – Ciclo-Oxigenase

GI – Gastrointestinal

ME – Miopatia do Exercício

NADPH-oxidase – Sistema Enzimático Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
Fosfato-oxidase

PCR – Proteína C Reativa

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

LASER - Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

MASER - Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LBP – Laser de Baixa Potência

HILT - High Intensity Laser Treatment

LILT - Low Intensity Laser Treatment

DP – Densidade de Potência

DE – Densidade de Energia

ATP - Adenosina Trifosfato

I.P – Via Intraperitoneal

ITS - Intermediary Toe Spread

TS - Toe Spread

PL – Print Length

SFI - Sciatic function index

H.E. - Hematoxilina-Eosina

TMB – tetrametilbenzidina

RT PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RNA – Ácido Ribonucléico

DNase – Enzima catalizadora do Ácido Desoxirribonucléico

cDNA – DNA Complementar

PBS – Tampão Fosfato Salina

NOS – Oxido Nítrico Sintetase

β -actina – Anticorpo Policlonal

SDS – Solução tampão Sódio Dodecil Sulfato

TBSt – Tampão Tris Salina com Tween

HPR – Peroxidase de Rabanete

NT – Nitrotirosina

S-NO – Oxido Nítrico Sintetase

AP – Fosfatase Alcalina

EPM – Erro Padrão Médio

ANOVA – Análise de Variância

IM – Intramuscular

PGE2 – Prostaglandina E2

RNA_m – Ácido Ribonucléico mensageiro

BSA – Bovine Serum Albumin

CK – Creatina Kinase

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

NO-GMP – Oxido Nítrico-Guanosina Monofosfato

iNOS – Óxido Nitrico Induzido

GMP_c – Guanosina Monofosfato Cíclico

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da estrutura de um Laser	28
Figura 2- Diferença da luz Laser da luz Convencional	29
Figura 3- Foto do sistema utilizado para alongamento do músculo tibial anterior.....	37
Figura 4- Equipamento Laser utilizado para irradiações dos animais	40
Figura 5- Fotografia de um rato andando em um corredor com as dimensões de 42 × 8,2 cm, em direção a uma caixa colocada num dos seus extremos, deixando as suas pegadas impressas na tira de papel	41
Figura 6- (A) Medição dos parâmetros numa pegada de um rato normal. (B) Face plantar do pé de um rato para ilustrar a correspondência anatômica dos parâmetros avaliados. PL = Comprimento da Pegada; TS; = Largura da Pegada; e ITS = Largura Intermédia da Pegada	42
Figura 7 - Músculo tibial anterior - Nervo tibial	43
Figura 8 - Preparação Músculo tibial - Nervo tibial. Músculo posicionado na horizontal e eletrodo ligado ao nervo tibial	44
Figura 9 – Caracterização do extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Os dados representam a média ± EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste <i>Student-Newman-Keuls</i> , ** p<0.01. vs CONT)	51
Figura 10 – Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo no período de 6 horas. Os dados representam a média ± EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste <i>Student-Newman-Keuls</i> , * p<0.05 vs. CONT e # p<0.05 vs. LESÃO)	52
Figura 11 – Caracterização dos níveis de Proteína C Reativa plasma de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Os dados representam a média ± EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste <i>Student-Newman-Keuls</i> , *** p<0.001 e ** p<0.01 vs CONT, #p<0.05 e ##p<0.01 vs Lesão 6h)	53
Figura 12 - Níveis de Proteína C Reativa (PCR) no plasma de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 6 horas. Os dados representam a média ± EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste <i>Student-Newman-Keuls</i> , ***p<0.01 vs. CONT e CONT + 3J, ###p<0.01 vs. LESÃO)	54

Figura 13 - Níveis de Proteína C Reativa (PCR) no plasma de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0.01 vs. CONT e CONT + 3J, ###p<0.01 vs. LESÃO55

Figura 14 - Níveis de TNF- α em músculo tibial anterior de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0.001 vs. CONT e CONT + 3J, ###p<0.001 vs. LESÃO)56

Figura 15 - Níveis de IL-1 β em músculo tibial anterior de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0.001 vs. CONT e CONT + 3J, ###p<0.001 vs. LESÃO)57

Figura 16 - Níveis de IL-6 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0.001 vs. CONT e CONT + 3J, ###p<0.001 vs. LESÃO)58

Figura 17 - Níveis de IL-10 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0.001 vs. CONT e CONT + 3J, ###p<0.001 vs. LESÃO)59

Figura 18 – Quantificação da expressão gênica de COX-1 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 4. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0,01 vs. CONT)60

Figura 19 –Quantificação da expressão gênica de COX-2 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 4. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *p<0.05 vs. CONT)61

Figura 20- Quantificação da expressão gênica de COX-1 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0.01, #p<0.05 vs. CONT, *p<0.05 vs. LESÃO, ***p<0.001 vs. LESÃO + DICLOFENACO, LESÃO + 3J, LESÃO + 6J, ^{xx}p<0.01 vs LESÃO + 3J)63

Figura 21- Quantificação da expressão gênica de COX-2 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 6 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *p<0.05 vs. CONT, com #p<0.05 vs. LESÃO E LESÃO + DICLOFENACO)64

Figura 22 - Quantificação de TNF- α por PCR em tempo real em músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes grupos no período de 6 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0.01 vs. CONT e CONT+ 3J, ##p<0,01 e *p<0.05 vs.LESÃO)65

Figura 23: Resultado de membrana representativa da curva temporal da expressão protéica de COX-1 (técnica de Western Blotting).N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Expressão Protéica COX-1)66

Figura 24: Resultado de membrana representativa da curva temporal da expressão protéica de COX-2 (técnica de Western Blotting).N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Expressão Protéica COX-2)67

Figura 25: Resultado de membrana representativa da expressão protéica de COX-1 (técnica de Western Blotting) dos grupos tratados. N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Expressão Protéica COX-1)68

Figura 26: Resultado de membrana representativa da expressão protéica de COX-1 (técnica de Western Blotting) dos grupos tratados. N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Expressão Protéica COX-2)69

Figura 27 - Quantificação de IL 10 por PCR em tempo real em músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes grupos no período de 6 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0.001 vs. CONT e CONT+ 3J, ###p<0,001 vs.LESÃO)70

Figura 28 – Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, lesão 6h, lesão 12h e lesão 24 h. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0.001 vs. CONT, ##p<0.01 vs.CONT)71

Figura 29 – Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclo., lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0,001 vs. CONT e CONT+3J, ###p<0,001 vs. LESÃO)73

Figura 30 – Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n

= 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ vs. CONT e CONT+3J, ### $p < 0,001$ vs. LESÃO)75

Figura 31 – Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ vs. CONT e CONT+3J, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. LESÃO)77

Figura 32 – Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ vs. CONT e CONT+3J, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. LESÃO)77

Figura 33 – Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ vs. CONT e CONT+3J, ### $p < 0,001$ vs. LESÃO)78

Figura 34 – Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls,)79

Figura 35 – Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls,)80

Figura 36- Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta a cada 10 minutos, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ** $p < 0,01$ vs. CONT e CONT+3J)81

Figura 37- Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta a cada 5 minutos, no total de 3 contrações tetânicas em animais controle e tratados. Os grupos tratados com a laserterapia não apresentaram resultados significativos82

Figura 38- Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta a cada 10 minutos, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, * $p < 0,05$ vs. CONT e CONT+3J e ## $p < 0,01$ vs. LESÃO)83

Figura 39 - Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta a cada 10 minutos, no total de 3 contrações tetânicas em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania **p<0.01, *p<0.05 vs. LESÃO e #p<0.05 vs. LESÃO + 9J, 2ª tetania *p<0.01 e #p<0.05 vs. LESÃO, 3ª tetania **p<0.01, *p<0.05 e #p<0.05 vs. LESÃO)84

Figura 40- Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *p<0,05 e ##p<0,01 vs. LESÃO)85

Figura 41- Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania **p<0.01 vs. LESÃO e LESÃO + DICLOFENACO, 2ª tetania ***p<0.001 vs. LESÃO, LESÃO + DICLOFENACO e LESÃO + 3J, 3ª tetania *p<0.05 vs. LESÃO + DICLOFENACO e **p<0.01 vs. LESÃO)86

Figura 42- Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *p<0.05 vs. LESÃO)87

Figura 43- Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania *p<0.05 vs. LESÃO, 2ª tetania ***p<0.001 vs. LESÃO, ##p<0.01 vs. LESÃO + DICLOFENACO e *p<0.05 vs. LESÃO + 3J, 3ª tetania **p<0.01 e *p<0.05 vs. LESÃO)88

Figura 44- Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0.01 vs. CONT E CONT +3J, *p<0.05 e #p<0.05 vs. LESÃO)89

Figura 45 - Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania *p<0.05, x p<0.05 e #p<0.05 vs. LESÃO, 3ª tetania *p< 0.05 vs. LESÃO)90

Figura 46- Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0.01 vs. CONT E CONT +3J, #p<0.05 e xxp<0.01 vs. LESÃO)91

Figura 47- Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania *p<0.05 e ##p<0.01 vs. LESÃO, 2ª tetania **p<0.01, ^{xx}p<0.01 e ##p<0.01 vs. LESÃO, 3ª tetania **p<0.01, *p<0.05 e ##p<0.01 vs. LESÃO)93

Figura 48 - Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *p<0,05 vs. CONT e CONT+3J, #p<0,05)94

Figura 49- Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0,01 vs. CONT e CONT+3J e ##P<0,01 vs. LESÃO) 95

Figura 50- Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0,01 vs. CONT e CONT+3J e ##P<0,01 vs. LESÃO)96

Figura 51- Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls).....97

Figura 52- Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0,01 vs. CONT e CONT+3J e ##P<0,01 e ^xp<0,05 vs. LESÃO).....98

Figura 53- Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls)99

Figura 54 - Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, *p<0,05 vs. LESÃO)100

Figura 55 - Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, , **p<0,01 vs. CONT e CONT+3J)...101

Figura 56 - Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{**}p<0.01$ e $^{***}p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J, $^{##}p<0.01$ vs. LESÃO).....102

Figura 57 - Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{***}p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J)103

Figura 58 - Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{**}p<0.01$ vs. CONT E CONT +3J, $^{*}p<0.05$ vs. LESÃO E DEXA, $^{***}p<0.001$ vs. LESÃO, DEXA e DIEL e $^{*}p<0.05$ vs DIEL).....104

Figura 59 - Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{***}p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J e $^{xxx}p<0.001$ e $^{###}p<0.001$ vs. LESÃO)105

Figura 60 - Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{***}p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J, $^{###}p<0.001$ vs. LESÃO).....106

Figura 61- Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{***}p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J, $^{##}p<0.01$, $^{xxx}p<0.001$ e $^{*}p<0.05$ vs. LESÃO).....107

Figura 62- Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{**}p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J, $^{##}p<0.01$ e $^{*}p<0.05$ vs. LESÃO).....108

Figura 63 - Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{**}p<0,01$ vs. CONT e CONT+3J).....109

Figura 64 - Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{**}p<0.05$ vs. CONT, $^{***}p<0.001$ e $^{##}p<0.05$ vs. LESÃO, LESÃO + DEXAMETAZONA respectivamente).....110

Figura 65 - Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{**}p<0.01$ vs. CONT E CONT +3J e $^{##}p<0.01$ e $^{###}p<0.001$ vs. LESÃO).....111

Figura 66 - Fotomicrografia – Pode-se observar a organização das fibras musculares ilesas, com os núcleos agrupados na periferia da célula, acidofilia uniforme na região central das fibras e discreto endomísio entre as fibras. 400X.....112

Figura 67 - Fotomicrografia – Pode-se observar a disposição irregular dos núcleos, sendo que alguns se encontram posicionados na região central da fibra; acidofilia irregular no interior das fibras, indicando rompimento das miofibrilas e o endomísio já apresenta sinais de congestão vascular. 400X.....113

Figura 68 - Fotomicrografia – Pode-se observar uma grande desorganização nas fibras musculares, as linhas de interrupção da acidofilia citoplasmática são bastante evidentes e posicionamento dos núcleos de maneira irregular. 400X.....114

Figura 69 - Fotomicrografia – Pode-se observar que os núcleos estão tendendo se posicionar na periferia das células, porém, a acidofilia citoplasmática continua, ainda, bastante evidente. É possível identificar pequenos focos hemorrágicos. 400X.....115

Figura 70 - Fotomicrografia – Pode-se observar que a organização das fibras musculares já se aproxima da organização normal. Não se observa a descontinuidade da acidofilia na região central das fibras, porém, alguns núcleos ainda estão deslocados para a região central. 400X.....116

Figura 71 - Fotomicrografia – Pode-se observar características de completa normalidade morfológica das fibras musculares, com os núcleos na periferia, acidofilia uniforme e discreto endomísio. 400X.....117

Figura 72 - Fotomicrografia – Pode-se observar a organização das fibras musculares ilesas, com os núcleos agrupados na periferia da célula, acidofilia uniforme na região central das fibras e discreto endomísio entre as fibras. 100X.....118

Figura 73 - Fotomicrografia – Pode-se observar que parte dos núcleos celulares encontram-se deslocados para a região central da célula, o endomísio apresenta sinais de congestão vascular e as áreas de perda da acidofilia se apresenta na forma de ilhas em algumas fibras e ocupam grandes extensão em outras. 100X.....119

Figura 74 - Fotomicrografia - Pode-se observar a disposição irregular dos núcleos, sendo que alguns se encontram posicionados na região central da fibra; acidofilia irregular no interior das fibras, indicando rompimento das miofibrilas e o endomísio apresenta sinais de congestão vascular. 100X.....120

Figura 75 - Fotomicrografia - Pode-se observar que a organização das fibras musculares próxima da organização normal. Não se observa a descontinuidade da acidofilia na região central das fibras, porém, algumas fibras apresentam perda da acidofilia. Alguns poucos núcleos ainda estão deslocados para a região central. 100X.....121

Figura 76 - Fotomicrografia - Pose-se observar a disposição irregular dos núcleos, sendo que alguns se encontram posicionados na região central da fibra; acidofilia irregular no interior das fibras, indicando rompimento das miofibrilas e o endomísio apresenta sinais de congestão vascular. 100X.....122

Figura 77 - Fotomicrografia – Pode-se observar algumas características bastante peculiares neste grupo. Parte dos núcleos celulares encontram-se deslocados para a região central da célula, o endomísio apresenta sinais de congestão vascular e as áreas de perda da acidofilia se apresenta na forma de ilhas nas diferentes fibras. 100X.....123

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Inflamação	21
1.2 Inflamação muscular	23
1.3 Laser	26
1.3.2 Elementos Básicos do Laser	27
1.3.3 Características do Laser	28
1.4 O Laser e sua ação	29
1.4.1 Terapias Anti-inflamatórias	29
2 HIPÓTESE	34
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Animais	36
4.2 Modelo de Lesão Muscular por alongamento Passivo	36
4.3 Grupos Experimentais	38
4.4 Terapia Laser de Baixa Intensidade	39
4.5 Avaliação Funcional	40
4.6 Estudo Eletrofisiológico	43
4.6.1 Preparação das amostras	43
4.7 Análise Histológica	45
4.8 Análises Bioquímicas	46
4.8.3 Avaliação dos níveis de citocinas em músculo esquelético	47
4.8.4 Análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR)	48
4.8.5 Análise da Expressão Protéica de COX-1 e COX-2 por Western-Blott	49
4.9 Análise Estatística	50
5 RESULTADOS	51
6 DISCUSSÃO	124
7 CONCLUSÃO	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

1 INTRODUÇÃO

O alongamento é utilizado como meio de profilaxia de lesões ou na promoção da qualidade de vida. É interessante ressaltar que a maioria dos estudos realizados refere-se a alongamentos intensos, o que seria entendido como treinamento de flexibilidade. O alongamento leve, como forma de relaxamento, certamente tem um efeito importante a todos que dele se utilizam (HASSINGER *et al.*, 1993; CROOK *et al.*, 2007).

A fibra muscular é incapaz de alongar-se ou estender-se sozinha, ou seja, para ocorrer o alongamento é necessário que uma força externa ao músculo seja empregada, como por exemplo a força da gravidade e a força dos músculos antagonistas. A literatura científica utiliza largamente o termo alongamento em diferentes contextos quando se fala em qualidade de vida, porém, é consenso afirmar que ela abrange os componentes da aptidão física. O alongamento é considerado relevante para a execução de movimentos simples ou complexos, para o desempenho desportivo e para manutenção e preservação da saúde (ARAÚJO, 1999; YLINEN *et al.*, 2007). Todavia, não estão bem elucidados quais são os níveis ideais de alongamento para uma melhor qualidade de vida de um indivíduo, uma vez que esses níveis variam em função da idade, gênero, raça e padrão de atividade física regular (REILLY, 1981; GOMES *et al.*, 2007).

No alongamento passivo, o indivíduo não contribui para gerar a força de alongamento, quando na ausência de contração ativa, o movimento é realizado por um agente externo (COSTA *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2009). Esse agente pode ser manual ou um equipamento de tração (IRRGANG, 1993; RUBINI *et al.*, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2009).

Está bem estabelecido na literatura que as lesões musculares induzidas por alongamento passivo, na maioria dos casos, ocorrem preferencialmente em regiões próximas às junções musculotendíneas através de rupturas parciais das fibras musculares (TAYLOR *et al.*, 1993; NOONAN *et al.*, 1994; GAJDOSIK, 2001; McCOMAC, 1996; PEVIANI *et al.*, 2007; INOUE *et al.*, 2009). Segundo Nikolaou (1987) a ruptura das fibras musculares ocorre com uma força de tração superior a

80% do peso corporal do animal e essa lesão vem acompanhada de resposta inflamatória, processos de cicatrização e reparo tecidual.

1.1 Inflamação

A resposta inflamatória é um mecanismo fisiopatológico básico envolvendo interações complexas entre células do sistema imunológico (circulantes e residentes) e tecido vascular (células endoteliais e do músculo liso; TEDGUI e MALLAT, 2001), com objetivo de eliminar do organismo a causa inicial da lesão e suas conseqüências (KUMAR *et al.*, 1994; MEADOR *et al.*, 2009). Dependendo do tempo de duração, o processo inflamatório pode ser classificado como agudo ou crônico, uma vez que há, em parte, uma sobreposição entre ambos os processos.

O processo inflamatório agudo refere-se à resposta que começa de maneira abrupta e precoce, sendo caracterizada por três eventos principais mediados por moléculas solúveis ou por células do sistema imune: a) vasodilatação e diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo local sinalizando calor e rubor; b) permeabilidade vascular aumentada, ambos os eventos, conduzindo ao extravasamento de proteínas, assim como o recrutamento de leucócitos para o espaço extravascular e subsequente formação de edema (ou tumor) e, c) liberação de uma variedade de agentes pró-inflamatórios também capazes de produzir dor ou hiperalgesia (TROWBRIDGE e EMLING, 1996; AL-NAEMI e BALDWIN, 1999; YOSHIKAI, 2001; WEBSTER e GALLEY, 2003).

Tais eventos são responsáveis pelo reconhecimento do local da lesão através das células inflamatórias, com recrutamento específico de subpopulações de leucócitos, predominantemente polimorfonucleares (PMNs) nas primeiras 12 horas, com posterior remoção do agente ofensor e debridamento de células e tecidos danificados, além de reparo e restabelecimento do equilíbrio do sítio inflamatório (YOSHIKAI, 2001).

A reação inflamatória deixa de ser aguda após alguns dias, progredindo assim para a inflamação crônica, apresentando como característica uma resposta proliferativa. Esta resposta consiste no aumento do número de fibroblastos e

células endoteliais, assim como o afluxo de células do sistema imunológico - predominantemente macrófagos (TROWBRIDGE e EMLING, 1996).

Para que todos os eventos do processo inflamatório ocorram, são necessários mediadores humorais e celulares como: citocinas, proteases plasmáticas, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária (PAF), aminas vasoativas, neuropeptídeos e óxido nítrico. Esses mediadores liberados estão envolvidos na amplificação e propagação da resposta inflamatória (KUMAR *et al.*, 1994; FOEGH e RAMWELL, 2003; WEBSTER e GALLEY, 2003).

Independentemente do estímulo desencadeante do processo inflamatório, as células lesionadas ativam o sistema fagocítico mononuclear (monócitos circulantes e macrófagos teciduais) iniciando assim a cascata de eventos pela secreção das citocinas IL-1 (interleucina) e TNF (fator de necrose tumoral). No local, agem sobre as células da matriz ou estroma tecidual, principalmente fibroblastos e células endoteliais, causando assim, a liberação de um segundo conjunto de citocinas que incluem, além de IL-1 e TNF, também as IL-6 e IL-8 e as proteínas inflamatórias (MIP-1) e quimiotáticas de macrófagos. A MIP-1, juntamente com IL-1 e IL-8 atrai para o sítio inflamatório monócitos e neutrófilos, que secretam um terceiro conjunto de citocinas, incluindo o TNF- α e outros fatores quimiotáticos, que retroalimentam o processo inflamatório. O endotélio vascular desempenha um papel central na comunicação entre o sítio inflamatório e os leucócitos circulantes, tanto pela expressão de moléculas de adesão que facilitam a migração tecidual de monócitos e neutrófilos, quanto pela modificação do tônus vascular mediado por metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) e ainda pelo óxido nítrico e pelas cininas, causando vasodilatação (eritema), aumento da permeabilidade vascular (edema) e hipotensão arterial. A outra manifestação cardinal da inflamação é a dor, que tem como mediadores, além das prostaglandinas, a bradicinina, que também participa da ativação da cascata da coagulação (BAUMANN; GAULDIE, 1994; VOLTARELLI, 1994).

As prostaglandinas são produzidas a partir do ácido araquidônico, por duas isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX) a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é expressa na maioria dos tipos celulares regulando funções fisiológicas normais

como a contratilidade gastrointestinal (GI), a proteção da mucosa, agregação plaquetária e a manutenção da função renal. A COX-2 é considerada como essencial, mas não exclusiva do processo inflamatório (XIE *et al.*, 1991). Sua expressão é fisiológica em alguns tecidos (renal, cerebral e pulmonar), mas é predominante em locais de inflamação. Sua indução resulta na produção de prostaglandinas que contribuem para a dor, edema e destruição tecidual associada com os episódios agudos da inflamação (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998; DIONNE *et al.*, 2001) e, mais recentemente demonstrado, sua ativação também produz prostaglandinas que contribuem para os processos que levam a resolução da inflamação (WALLACE *et al.*, 1998; GILROY *et al.*, 1999) contribuindo, por exemplo, para a reparação de úlceras gástricas (FU *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 1999; MIZUNO *et al.*, 1997; MA; DEL SOLDATO; WALLACE, 2002; SCHMASSMANN *et al.*, 2006).

1.2 Inflamação muscular

O exercício físico não habitual e exaustivo, ou de alta intensidade, acaba por induzir alterações estruturais, ultra-estruturais e bioquímicas de caráter focalizado e reversível (XIONG *et al.*, 2009; ROBERTS; WILSON, 2007; DUARTE, 1993; MAGALHÃES, 1996; MAGALHÃES, 2000; MOTA, 1995). Tais alterações possuem características de uma doença aguda, chamada de Miopatia do Exercício (ME). Existem evidências de que a grande abundância de sinais e sintomas que estão associados a ME é dependente do tipo de contração (excêntrica vs. concêntrica), da intensidade, duração (PHILIPPOU *et al.*, 2009; DUARTE, 1993; MAGALHÃES, 2000; SOARES, 1989) e fatores que relacionam-se ao próprio indivíduo, como a idade e seu nível de condicionamento físico (SOARES, 1989; BAXTER, 1993).

Existem na literatura diversas evidências já descritas quanto a métodos indiretos de lesão muscular, principalmente em humanos. Para tal podemos citar a diminuição acentuada da força isométrica máxima voluntária (MACINTYRE, 1996; NEWHAM, 1983; NOSAKA, 2001; BUFORD *et al.*, 2009), o aumento significativo

da sensação de desconforto muscular (APPEL, 1992; CLARKSON, 1986; FRIDÉN, 1986; BISLAND *et al.*, 2007), o aumento significativo das concentrações da creatina quinase plasmática (BUFORD *et al.*, 2009; LAPOINTE; FRÉMONTÉ; CÔTÉ, 2003; FOLEY *et al.*, 1999; CLARKSON, 1992; ARMSTRONG, 1990; EBBELING, 1989), e das IL-1 β e IL-6, lactato desidrogenase e transaminase oxalacética glutâmica (CHEN; HSIEH, 2001; BOULNOIS, 1985). Os níveis dessas citocinas estão elevados quando ocorre lesão muscular aguda, entretanto, não existe uma relação quantitativa entre esses marcadores e a lesão.

Já a análise em animais experimentais envolve os métodos diretos, onde o músculo é retirado e analisado histologicamente.

O alongamento passivo ultrapassando a plasticidade muscular e a amplitude articular provoca microlesões nas fibras musculares, induzindo a dor após o treinamento. Essas microlesões, além da dor, provocam edema e aumento da síntese de proteínas e uma conseqüente sensação de aumento no tamanho do músculo (WARREN, 1993 a; LAROCHE; CONNOLLY, 2007; LIU *et al.*, 2009).

As mudanças histoquímicas e morfológicas nas fibras musculares que ocorrem devido a esse tipo de exercício podem afetar o bom funcionamento do músculo (TEAGUE, 1995; PHILIPPOU *et al.*, 2009). Portanto, as principais alterações morfológicas que ocorrem em nível estrutural e ultra-estrutural nas fibras musculares estriadas esqueléticas após o alongamento passivo intenso, são identificadas por desarranjos e rompimento de miofilamentos, de linhas Z, de sarcômeros, rompimento da arquitetura e desorganização das organelas, rompimento do sarcolema, atividade lisossomal acentuada, presença de células inflamatórias e/ou células satélites, basofilia, onde ocorre o aumento da atividade ribossômica, núcleos centralizados com nucléolos proeminentes, caracterizando síntese protéica e hipercontração dos miofilamentos, que indica acúmulo de cálcio (GARRETT JÚNIOR, 1996, CARPENTER; KARPATI, 1984; GOMES *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007).

Um dos mecanismos que desencadeia a lesão é o influxo excessivo de cálcio, que por sua vez é gerado pelos danos ocorridos no sarcoplasma ou no retículo sarcoplasmático da fibra. Esse processo leva à perda da homeostase e

estímulo para a proteólise cálcio-dependente, provocando assim, uma degeneração tecidual (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; BUFORD *et al.*, 2009).

Após a lesão, ocorrem alterações nas populações de células inflamatórias circulantes. Inicialmente neutrófilos e posteriormente monócitos e linfócitos são recrutados para o sítio inflamatório onde produzem enzimas proteolíticas para a limpeza e reparo do tecido lesionado. Fatores quimiotáticos estimulam a infiltração de neutrófilos, incluindo prostaglandinas, TNF- α e as interleucinas IL-1 β e IL-6. Os neutrófilos fagocitam a fibra muscular lesionada por meio de ativação do sistema enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH-oxidase) e da liberação de enzimas proteolíticas a partir dos seus grânulos intracelulares. Essa resposta não é específica, podendo acarretar lesão de células normais adjacentes ao local lesionado (NIEMAN *et al.*, 2005; HONG *et al.*, 2009).

De forma inicial ocorre a síntese das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , as quais estimulam a síntese de IL-6. A IL-6 tem um papel de mediador primário da reação de fase aguda, estimulando a produção hepática de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR) e inibidores de proteases (como o inibidor de protease α -1). A resposta de fase aguda restaura proteínas depletadas ou lesadas e ainda reverte os efeitos prejudiciais da resposta inflamatória inicial, assim, vista desse ângulo, a IL-6 desempenha um papel mais restaurativo do que pró-inflamatório e ainda estimula a glândula hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), aumentando a liberação do hormônio cortisol a partir do córtex adrenal (NIEMAN *et al.*, 2003; NIEMAN *et al.*, 2005; LIRA *et al.*, 2009).

Diferentes tipos de terapias, farmacológicas e não-farmacológicas, têm sido utilizados com o objetivo de prevenir ou ao menos amenizar os resultados deletérios deste tipo de esforço. Dentre estes, podemos citar: a) drogas anti-inflamatórias; b) suplementos nutricionais como creatina, arginina, etc; c) crioterapia; d) massoterapia; e) eletroterapia e f) terapia laser de baixa potência.

1.3 Laser

1.3.1 Conceito e Histórico

A palavra Laser origina-se do acrônimo (palavra formada pelas iniciais de outras palavras) de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (óptica) sem qualquer relação com a radiação ionizante (CHAVANTES; JATENE, 1990). A emissão estimulada foi descrita pela primeira vez por Albert Einstein em 1917. Esta teoria foi verificada por Landberg em 1928, porém somente em 1993 Townes e Webber falaram pela primeira vez em amplificação de microondas (ALMEIDA-LOPES, 2001).

O primeiro aparelho em que se usou a emissão estimulada foi chamado de MASER, outro acrônimo em inglês ("Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation"), construído por Townes em 1952. Weber propôs no mesmo ano a amplificação do MASER, tendo sua teoria publicada em 1953 (ALMEIDA-LOPES, 2001; BRUGNERA e PINHEIRO, 1998).

O primeiro Laser da história foi construído em 1960 por Theodore Maiman na Califórnia – USA (MAIMAN, 1960), era um Laser de Rubi, operando em 694,3 nm. Em 1961 foi fundado na Universidade de Cincinnati por Leon Goldman, o primeiro laboratório de Laser para aplicações médicas, onde as primeiras experiências em animais foram realizadas (GOLDMAN, 1981; CARDOSO, 2006).

Em 1964, na antiga União Soviética, outros cientistas como Basov e Prokhorov trabalhavam no desenvolvimento do Laser, onde fizeram grandes progressos nessa área e juntos com Townes ganharam o prêmio Nobel em 1966 (ALMEIDA-LOPES, 2001).

1.3.2 Elementos Básicos do Laser

Para a construção de um Laser, são necessárias condições especiais: em primeiro lugar é necessário um “meio ativo”, que deve ser composto por substâncias gasosas, líquidas, sólidas ou podendo ocorrer suas associações que serão capazes de gerar luz quando forem excitadas por uma fonte de energia externa. Esta excitação é denominada bombeamento, e tem a função de transformar o meio ativo em um meio amplificador de radiação, isso nada mais é o fenômeno de Inversão de População, no qual os elétrons da camada da valência do meio absorvem a energia bombeada e avançam para um nível de energia mais externo. Pelo fato desse segundo nível se encontrar mais distante da influência do núcleo, seu nível de energia é maior se encontrando em estado meta-estável. Quando o elétron decai, voltando ao nível de menor energia, acontece uma liberação de um “pacote” de energia concentrado, o fóton. Esse fóton liberado excita o decaimento dos outros átomos que se encontram no estado estável, isso acaba por gerar um processo em cascata que resulta em uma emissão estimulada de radiação (SCHAWLOW, 1995; COUTINHO *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2004).

O meio ativo citado anteriormente deve estar em um reservatório com o nome de Cavity Ressonante. Nessa cavidade deverá conter dois espelhos localizados nas extremidades, sendo um de reflexão total (100 %) e o outro de reflexão parcial (97 %), assegurando que o sistema que é composto por uma reação óptica e o meio ativo sejam a sede de uma oscilação Laser. A cavidade do Laser é composta por espelhos localizados em suas extremidades, portanto, essa radiação é amplificada e os fótons que serão emitidos por estimulação entram em fase (na mesma direção) assim permitindo que aconteça um incremento a cada viagem (reflexões múltiplas) completada dentro da cavidade (KARU *et al.*, 1998; CROOK, 2007).

Figura 1: Esquema da estrutura de um Laser.

1.3.3 Características do Laser

O Laser por ser uma luz, possui o comprimento de onda, que pode ser refletido, absorvido ou transmitido e sofrer ou não espalhamento. No entanto, é um tipo de luz com algumas características especiais como: unidirecionalidade, coerência e monocromaticidade. A luz pode ser explicada como sendo pequenos pacotes de energia (fótons) em uma trajetória ondulatória. O Laser é uma luz que apresenta fótons idênticos que se propagam em trajetórias paralelas, ao contrário da luz comum que apresenta fótons de comprimentos de ondas diversos e que são emitidas e se propagam em uma forma desordenada. O Laser ainda é uma luz coerente no qual os picos e os vales de suas trajetórias com o formato de onda dos elétrons que a compõem, coincidem-se em termos de sentido, direção, amplitude, comprimento e fase. São todos esses aspectos que diferem a luz Laser da luz comum, a qual não há sincronia entre os fótons emitidos (KARU *et al.*, 1998).

<i>Luz Convencional</i>	<i>Laser</i>
Policromática – espectro de cores	Monocromática
Fonte Izotrópica	Fonte colimada e direcional
Não é um feixe	Feixe de luz coerente

Figura 2: Diferença da luz Laser da luz Convencional (GENOVESE, 2000).

1.4 O Laser e sua ação

1.4.1 Terapias Anti-inflamatórias

Embora o uso de laser nas mais diversas áreas da medicina, odontologia, fisioterapia venha crescendo vertiginosamente nas duas últimas décadas, o conhecimento básico de seu funcionamento ainda é muito deficiente pelos profissionais, principalmente aqueles que não foram especificamente treinados.

No Brasil, a introdução da tecnologia do laser foi bastante tardia em comparação com outros países, principalmente Europa e Estados Unidos. Os trabalhos pioneiros nesta área datam da segunda metade da década de 80. Posteriormente, trabalhos na área foram publicados por Genovese em São Paulo e Pinheiro e colaboradores, inicialmente na Inglaterra e posteriormente em Recife (MICKILEY *et al.*, 1988; DEMIDOVA *et al.*, 2007).

O efeito da estimulação com Laser de Baixa Potência (LBP) depende do comprimento de onda, da dose e da intensidade da luz utilizada na irradiação (MICKILEY *et al.*, 1988).

A coerência é uma das propriedades da luz Laser, como citada acima, mas ao penetrar no tecido, esta propriedade se perde nos primeiros extratos da pele. Isto ocorre devido à grande variedade de estruturas celulares que compõe a pele (MICKILEY *et al.*, 1988). Segundo esses autores, apesar de perder sua coerência, a radiação do LBP no interior dos tecidos é absorvida pelas células gerando

alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundos (SVAASAND, 1990; HERMAN *et al.*, 1989).

Os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos: os lasers cirúrgicos de alta potência (HILT- High -Intensity Laser Treatment) e lasers não-cirúrgicos de baixa potência (LILT- Low –Intensity Laser Treatment).

Em geral até o momento quase todas as aplicações com HILT tomam por base os efeitos fototérmicos e fotoablativos do laser com o tecido assim, o laser é usado para cortar, destruir tecidos, soldar, remover tatuagens, entre outros efeitos. Em contraste, mais recentemente, nas décadas de 60 e 70 os pesquisadores voltaram-se para as aplicações com LILT, e essas baseiam-se nas interações atérmicas da luz do laser com o tecido, produzindo efeitos de Biomodulação (KARU, 1998; BASFORD, 1995; BASFORD, 1993; BASFORD, 1989; BASFORD, 1986; HEUSSLER *et al.*, 1989).

A terapia com Laser de Baixa Potência, incide sobre as reações não térmicas (atérmicas) da luz com o tecido ocasionando efeitos fotoquímicos (SCHAFFER *et al.*, 2000, HONMURA, *et al.* 1993), ou seja, radiações com baixa densidade de potência (DP) $0,01 \text{ w/cm}^2$ a 1 w/cm^2 e também baixa densidade de energia (DE) de 1 a 10 J/cm^2 (SCHINDL *et al.*, 2000) nesses limites se produz um pequeno e não significativo aumento de temperatura, o qual não ultrapassa 1°Celsius (KARU, 1987).

O efeito fotoquímico ocorre devido à presença de fotorreceptores especialmente sensíveis a determinados comprimentos de onda. A absorção desses fótons por biomoléculas intracelulares específicas produz estimulação ou inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas. Então estas ações determinarão mudanças fotodinâmicas em cadeias complexas e moléculas básicas de processos fisiológicos com conotações terapêuticas (KARU *et al.*, 1987; HIKI *et al.*, 1992).

O LBP age principalmente sobre organelas celulares (mitocôndrias e membranas), gerando aumento da síntese de Adenosina Trifosfato (ATP) e modificando o transporte iônico, sendo que esses processos ocorrem por meio dos fotorreceptores celulares, descrito acima. Dessa forma o LBP acelera, a curto

prazo, a glicólise e a oxidação fosforilativa e a longo prazo a transcrição e a replicação do DNA (KARU *et al.*, 1988; HEIANG *et al.*, 2000; KILIK *et al.*, 2007).

O tecido biológico é pouco homogêneo do ponto de vista óptico, assim toda a radiação eletromagnética ao incidir sobre o tecido, se desdobra, uma parte é refletida e a outra absorvida. A reflexão varia com o ângulo de incidência da luz e as propriedades ópticas da superfície do tecido. Anderson, *et al.*, 1981 comprovou que a reflexão da pele quando se incide perpendicularmente é de 4-7 %, variando para mais com a aplicação de pomadas, líquidos e secreção sebácea. Então, de 93-97 % da irradiação incidente na superfície penetra nos substratos subsequentes, na pele e na derme, encontrando substâncias com índices de refração diferentes. Dessa forma os fótons vão se distribuir de acordo com a absorção de cada estrutura, pois a função fotorreguladora determina qual comprimento de onda cada estrutura é capaz de absorver e com isso promover transformações na atividade funcional e metabólica da célula (LEE *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2009).

A função fotorreguladora ocorre em função dos fotorreceptores, os fotorreceptores são moléculas de variedade morfológica, que se encontram distribuídas nas células do organismo, entre elas: flavoproteínas, porfirinas, citocromo, tirosinas, asparagina; essas moléculas interferem no metabolismo celular sem a necessidade de energia luminosa, mas se incidir sobre elas uma radiação com comprimento de onda específico são capazes de absorver os fótons da radiação e provocar variações no metabolismo celular (MEIJER *et al.*, 1996).

Até alguns anos atrás havia poucos estudos relatando a eficácia do laser de baixa potência em seu efeito anti-inflamatório, e dentre os que são relatados, estes estão em associação com o tratamento analgésico (NISHIDA *et al.*, 1990; BLIDDAL *et al.*, 1987; HONMURA, *et al.*, 1993; BROSSEAU *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 1998).

Acredita-se que a ação do laser de baixa potência sobre o tecido está relacionada à possibilidade dele inibir o aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação; de interferir com os efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação (CAMPANA *et al.*, 1998; CAMPANA *et al.*,

2000; RIGAU, 1996); inibir a síntese das prostaglandinas (SATTAYUT *et al.*, 2000) além de inibir o esfíncter pré-capilar, através de mediadores químicos. Estudos adicionais sobre o efeito anti-inflamatório do laser de baixa potência tem sido realizados por nosso grupo, para auxiliar no esclarecimento dos possíveis mecanismos de ação esta terapia em diferentes situações.

O uso de lasers na prática clínica para o efeito anti-inflamatório em diferentes patologias baseia-se em um número já razoável de publicações de caráter científico.

Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos aleatorizados, placebo-controle foram realizados, fazendo com que a Terapia Laser já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças (VASSELJEN, 1992; VILLARROYA, 1994; YASUKAWA *et al.*, 2007).

Recentemente, vimos acumulando experiência em trabalhos experimentais e clínicos com a aplicação do Laser de Baixa Potência em diferentes situações. (CHOW *et al.*, 2009; LEAL JUNIOR E.C. *et al.*, 2008; BJORDAL JM *et al.*, 2008; STERGIOULAS A., *et al.* 2008; CORREA F. *et al.*, 2007; BJORDAL J.M. *et al.*, 2007; AIMBIRE F. *et al.*, 2007; AIMBIRE *et al.*, 2006a, b e c; LOPES-MARTINS *et al.*, 2006 a e b; BJORDAL *et al.*, 2006 a, b e c; LOPES-MARTINS *et al.*, 2005; AIMBIRE *et al.*, 2005; ALBERTINI *et al.*, 2002, 2004, 2007). Durante este tempo, fomos capazes de caracterizar o efeito da Terapia com Laser de Baixa Potência na reação inflamatória de edema de pata, pleurisia e dermatite, hiper-reatividade de vias aéreas em ratos e camundongos, e tendinite de Tendão de Aquiles em humanos. No entanto, é muito importante ressaltar que muito pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação do laser infravermelho. Neste sentido, os estudos experimentais com estes comprimentos de onda assumem grande relevância para o esclarecimento do mecanismo de ação da terapia. Atualmente os lasers de comprimento de onda na faixa do infravermelho são os mais utilizados em doenças inflamatórias articulares e músculo-esqueléticas, sem sombra de dúvida.

Tendo em vista os dados apresentados anteriormente, a importância da utilização de terapias não medicamentosas representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde, especialmente em países subdesenvolvidos.

No entanto, o estabelecimento de parâmetros clínicos para a utilização desta técnica se faz ainda extremamente necessário.

2 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que a Terapia Laser de Baixa Potência operando na região do Infravermelho próximo (810 nm) possua ação antiinflamatória e ainda, seja capaz de acelerar o processo de recuperação muscular após lesão muscular aguda induzida por estiramento.

3 OBJETIVOS

Dentro do cenário de novas tecnologias e estratégias terapêuticas utilizadas para o tratamento das disfunções músculo-esqueléticas, entre elas o estiramento muscular, objetivamos estudar:

- Os efeitos da Terapia Laser de Baixa Potência aplicada no processo inflamatório induzido por alongamento passivo em ratos;
- Estudar os possíveis mecanismos de ação da Terapia Laser de Baixa Potência no modelo de alongamento passivo em ratos;
- Estabelecer bases para o desenvolvimento de um protocolo experimental e clínico eficaz.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando em torno de 200g provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP. Os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura (22-24°C), umidade relativa (40-60 %), ciclo de 12 horas claro-escuro com água e ração *ad libitum*. Os ratos foram randomizados e divididos em grupos de 6 animais. Nossos protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB_USP) (nº 115).

4.2 Modelo de Lesão Muscular por alongamento Passivo

Para o protocolo de alongamento do músculo tibial anterior, foi adaptado o protocolo de Nikolaou *et al.* (1987). Segundo o protocolo original de Nikolaou, o alongamento seria realizado diretamente no tendão distal do músculo tibial anterior, após uma vulsão, a fim de separar o músculo tibial do tecido subcutâneo juntamente com a pele. Para tal procedimento adentrava-se no pequeno corte já realizado com uma tesoura fechada sobre o músculo, retornando no sentido caudal com a tesoura aberta, expondo todo o músculo do animal. Em seguida, com o auxílio de um bisturi, o tendão era separado de sua inserção.

Ao término do alongamento, a incisão era fechada e o animal recebia uma única dose de antibiótico.

Em nosso protocolo, foi decidido pelo alongamento sem exposição cirúrgica do músculo, para evitar recrutamento de células inflamatórias e outras alterações histopatológicas.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina:xilazina (80:16 mg/Kg; König, Avellaneda, Argentina), por via intraperitoneal (i.p), antes de serem submetidos ao protocolo de alongamento passivo do músculo tibial anterior.

Após pesagem do animal, ele foi posicionado, em decúbito dorsal, sobre cortiça acoplada ao sistema de alongamento. O membro posterior direito foi firmemente preso com linha, que passa por uma roldana e se prende a uma pisseta com volume de água que correspondeu a 150 % do corporal do animal. Esta linha foi fixada sobre o dorso da pata do animal, realizando uma flexão plantar, alongando o músculo tibial anterior da pata posterior direita do animal. O protocolo foi realizado uma única vez sendo que o animal recebeu a tração durante 20 minutos, descansou por 3 minutos e recebeu mais uma tração durante 20 minutos.

Figura 3 : Foto do sistema utilizado para alongamento do músculo tibial anterior.

4.3 Grupos Experimentais

Caracterização da curva de tempo relacionada com a lesão muscular induzida por alongamento passivo utilizando o corante azul de Evans para determinar o extravasamento plasmático no músculo tibial anterior de ratos Wistar:

Grupo 1 - Controle – Hígido.

Grupo 2 - Pré Lesão – foi inoculado azul de Evans 1 hora antes do protocolo de alongamento passivo – 40 min de alongamento passivo e sacrificado imediatamente após o protocolo de alongamento passivo.

Grupo 3 - Lesão 1 h – 40 min de alongamento passivo - foi injetado azul de Evans imediatamente após o protocolo de lesão e sacrificado 1 horas após.

Grupo 4 – Lesão 3h - 40 min de alongamento passivo - foi injetado azul de Evans 1 horas antes do sacrifício e sacrificado 3 horas após o protocolo alongamento passivo

Grupo 5 – Lesão 6h - 40 min de alongamento passivo - foi injetado azul de Evans 1 horas antes do sacrifício e sacrificado 6 horas após o protocolo alongamento passivo.

Grupo 6 – Lesão 12h - 40 min de alongamento passivo - foi injetado azul de Evans 1 horas antes do sacrifício e sacrificado 12 horas após o protocolo alongamento passivo.

Grupo 7 – Lesão 24h - 40 min de alongamento passivo - foi injetado azul de Evans 1 horas antes do sacrifício e sacrificado 24 horas após o protocolo alongamento passivo.

Caracterização da curva de tempo relacionada a lesão muscular induzida por alongamento passivo utilizando a técnica de PCR Real Time para determinar a quantificação da expressão de COX-1 e COX-2 no músculo tibial anterior de ratos Wistar:

Grupo 1 – Controle – Hígido

Grupo 2 – Lesão 6h - 40 min de alongamento passivo

Grupo 3 – Lesão 12h - 40 min de alongamento passivo

Grupo 4 – Lesão 24h - 40 min de alongamento passivo

Caracterização da curva de tempo relacionada com a lesão muscular induzida por alongamento passivo na avaliação do Índice Funcional:

Grupo 1 – Controle – Hígido

Grupo 2 – Lesão 6h - 40 min de alongamento passivo

Grupo 3 – Lesão 12h - 40 min de alongamento passivo

Grupo 4 – Lesão 24h - 40 min de alongamento passivo

Protocolo Laser

Protocolo – Irradiação com Laser 810 nm (200 mW)

O músculo tibial anterior foi irradiado na região músculo-tendínea.

Grupo 1 – Controle

Grupo 2 - Controle + Laser 3J (CONT+3J)

Grupo 3 - Lesão – 40 min de alongamento passivo

Grupo 4 - Lesão + Diclofenado (1 mg/kg I.M. 30 min Antes da indução da lesão) - 40 min de alongamento passivo (LES+DICL)

Grupo 5 – Lesão - 40 min de alongamento passivo + Laser 1J (LES+1J)

Grupo 6 - Lesão - 40 min de alongamento passivo + Laser 3J (LES+3J)

Grupo 7 - Lesão - 40 min de alongamento passivo + Laser 6J (LES+6J)

Grupo 8 - Lesão - 40 min de alongamento passivo + Laser 9J (LES+9J)

4.4 Terapia Laser de Baixa Intensidade

Foi utilizado um laser de baixa potência do tipo Thera-laser (DMC®0), operando no comprimento de onda de 810 nm, em diferentes doses de energia (1J, 3J, 6J e 9J). Figura 4.

Figura 4: Equipamento Laser utilizado para irradiações dos animais.

4.5 Avaliação Funcional

A avaliação funcional foi realizada utilizando a *walking track analysis*, descrita por De Medinacelli, 1982. Na *walking track analysis* o animal foi colocado em um corredor de madeira com acesso a um ambiente escuro e sobre o corredor foi colocado um papel com a mesma largura, o rato que foi testado estava com as patas traseiras marcadas com tinta. O início da avaliação se deu com o animal sendo liberado no início do corredor, por onde caminhou em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as marcas das patas traseiras (Figura 5). Todos os ratos tiveram uma adaptação e exploração do local, bem como o registro da normalidade de cada animal, antes do procedimento de alongamento passivo.

Figura 5: Fotografia de um rato andando em um corredor com as dimensões de 42 × 8,2 cm, em direção a uma caixa colocada num dos seus extremos, deixando as suas pegadas impressas na tira de papel. Fonte: VAREJÃO (2003).

O teste foi realizado antes do protocolo de alongamento e 1h antes do sacrifício de cada grupo. As seguintes medidas foram coletadas com paquímetro após o registro em papel: 1) o espaço entre a segunda e a quarta falange distal (ITS *intermediary toe spready*): 2) o espaço entre a primeira e a quinta falange distal (TS *toe spready*) e 3 o espaço entre a borda proximal do pé e a terceira falange distal (PL *print length*) (Figura 6),

Figura 6: **(A)** Medição dos parâmetros numa pegada de um rato normal. **(B)** Face plantar do pé de um rato para ilustrar a correspondência anatômica dos parâmetros avaliados. PL = Comprimento da Pegada; TS; = Largura da Pegada; e ITS = Largura Intermédia da Pegada. Fonte: VAREJÃO (2003).

Após os valores encontrados nos testes de *walking track* foi realizado o cálculo do SFI (sciatic function index), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{SFI} = -38,3 \times \frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}} + 109,5 \times \frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} + 13,3 \times \frac{\text{EITS} - \text{NITS}}{\text{NIT}} - 8,8$$

As medidas foram identificadas pela letra E, para a pata em estudo, e pela letra N, para a pata normal.

Para a interpretação dos resultados, foram subtraídas as médias pré lesão da pós lesão.

4.6 Estudo Eletrofisiológico

4.6.1 Preparação das amostras

O animal foi anestesiado com Ketamina e Xilazina (100 mg/kg e 20 mg/kg respectivamente) e fixado numa mesa cirúrgica. Em seguida, o animal foi submetido a um pequeno corte na pele próximo a região plantar do metatarso. Neste momento foi realizada uma vulsão, a fim de separar o músculo tibial do tecido subcutâneo juntamente com a pele, para tal procedimento adentramos no pequeno corte já realizado com uma tesoura fechada sobre o músculo, retornando no sentido caudal com a tesoura aberta, expondo todo o músculo do animal. Então, com o auxílio de um bisturi, o tendão foi separado de sua inserção e amarrado a um fio. O próximo passo foi remover a fascia muscular e dessa forma tornando mais fácil o isolamento do músculo. Após a secção, o músculo foi puxado no sentido contrário a sua inserção através do fio, de forma a ficar isolado da tíbia. (Figuras 7 e 8)

Figura 7 - Músculo tibial anterior - Nervo tibial. Fonte: LABAT (2002).

Figura 8 - Preparação Músculo tibial - Nervo tibial. Músculo posicionado na horizontal e eletrodo ligado ao nervo tibial. Fonte: LABAT (2002).

Durante todo o procedimento de estimulação do músculo tibial anterior, o mesmo foi mantido hidratado com solução salina (0,09 %). Na região da inserção, próximo a região plantar do metatarso, o músculo, através do tendão foi conectado a um transdutor isométrico (Ugo Basile®; Varese, Italy) e o nervo ciático a um eletrodo bipolar.

O músculo foi submetido a uma tensão constante de 10 g. A preparação foi estimulada indiretamente por pulsos de 6-7 V, 0,2 Hz e 2 ms. de duração. As contrações musculares em resposta aos estímulos indiretos foram registradas em fisiógrafo GEMINI 7070 da UGO BASILE® através do transdutor isométrico. Para induzir a contração tetânica, elevou-se a frequência para 60 Hz. A fadiga muscular foi caracterizada pela incapacidade de se manter a contração muscular, havendo o decaimento da amplitude em 50 % da máxima registrada, para se evitar a morte do tecido, decorrente da contração tetânica.

Para cada grupo, foram realizadas as contrações tetânicas a cada 10 minutos, no período de 30 minutos, perfazendo um total de 3 contrações para cada animal de cada grupo.

A partir dos registros, foram analisados:

- a) a intensidade da força de contração (amplitude) em gramas;
- b) o tempo necessário para que a contração decaísse a metade da máxima (50 % de fadiga muscular) em segundos;
- c) a área sob a curva tempo X intensidade.

4.7 Análise Histológica

4.7.1 Microscopia de luz (óptica)

As amostras do tecido foram fixadas em formol a 10 % por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras foram desidratadas e submetidas a uma série gradativa de banhos de álcool, começando com 50 % e progredindo até o álcool absoluto 100 % (SYNTH). Em seguida os músculos foram diafanizados com Xilol por 4 horas (SYNTH) para impregnação e inclusão em Paraplast ® das amostras. Em seguida, estas foram colocadas em recipientes de alumínio adequados, com Paraplast ® fundido por 4 horas. Após a impregnação, as amostras foram colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina fundida e deixadas para endurecer, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia foram realizados cortes com 5 µm de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT, e foram levados e colocados em banho-maria. Uma vez precedido o preparo das amostras os cortes foram colocados em lâminas para serem corados, com o corante Hematoxilina-Eosina (H.E.). Após a coloração os cortes foram montados em lâminas permanentes para posterior análise com o microscópio óptico e fotografadas através de sistema de microfotografia (Olympus System Microscope Model CX 41 – Olympus PM10SP Automatic Photomicrographic System).

4.8 Análises Bioquímicas

4.8.1 Extravasamento De Azul de Evans

A determinação do extravasamento de Evans como marcador de alteração de permeabilidade vascular em músculo tibial de ratos foi realizada de acordo com Moitra (2007). Uma solução de azul de Evans (MERCK artigo 3169) a 2,5 % foi preparada em solução salina e posteriormente filtrada em membrana esterilizante (0,22 μ m; MILLIPORE).

Após anestesia com ketamina e xilazina, os animais receberam o corante azul de Evans (25 mg/Kg, intravenosa) 1h antes de serem sacrificados. Após o sacrifício dos animais, com superdose de anestésico, o músculo foi coletado, pesado e posteriormente conservado por 24 h a 37 °C em um tubo de vidro com solução de formamida (MERCK artigo 9684.1000, 5 ml/g) para extração do azul de Evans das amostras do músculo.

Em seguida, os tubos foram agitados mecanicamente por 15 segundos em agitador (PHOENIX® modelo AT 56) e finalmente 200 μ l do corante extraído pela formamida foram transferidos para microplacas de 96 poços para leitura de absorbância em leitor de ELISA (Espectra Max plus 384, EUA) a 620 nm. Solução de formamida foi usada como branco para o teste. As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante (concentrações entre 1000 e 9 μ M). As concentrações das amostras foram calculadas em nanogramas de azul de Evans por miligrama de tecido muscular.

4.8.2 Proteína C Reativa

A Proteína C Reativa Látex (PCR) foi determinada de acordo com o kit comercial da Wiener Lab (Argentina) conforme descrito por SINGER *et al.* (1957). É um teste de aglutinação em lâmina qualitativo e semi-quantitativo para a determinação rápida da PCR, em amostras diluídas de soro, pela reação com anticorpos específicos absorvido sobre um suporte inerte de látex. Se uma amostra possui PCR ela reage com a suspensão de látex e uma aglutinação visível é formada em 2 minutos.

Para determinações semi-quantitativas as amostras de soro foram diluídas de maneira progressiva com solução salina (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc). A última diluição com resultado positivo (aglutinação) foi usada para calcular a concentração de PCR na amostra.

A concentração aproximada de PCR na amostra foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{PCR (mg/l)} = \text{título} \times \text{sensibilidade de reação (6 mg/l)},$$

Onde o título é a inversa da máxima diluição na que se produziu aglutinação visível macroscopicamente.

4.8.3 Avaliação dos níveis de citocinas em músculo esquelético

As dosagens das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 nas amostras de tibial anterior foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (R&D System, EUA). Para isto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo monoclonal para cada citocina: anti-IL1 β e IL-6 foram diluídos em tampão carbonato de sódio (0,1M, pH 9,6), enquanto anti IL-10 e TNF- α foram diluídos em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,5). As placas foram incubadas (4 °C) por 18 h. Para o bloqueio, as placas foram lavadas

com PBST (solução PBS contendo 0,05% de Tween 20) por 4 vezes e depois preenchidas com 300 µl/poço de solução de bloqueio (3 % gelatina em PBST, Sigma) à 37 °C por 3 horas e submetidas a novo ciclo de lavagens. A seguir, 100µl das amostras devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa e deixadas por 18 h em temperatura de 4 °C. Após lavagem, 100 µl dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina foram acrescentados e deixados por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem das placas, o volume de 100 µl de estreptavidina – peroxidase foi adicionado e deixado por 1 h em temperatura ambiente (22 °C) seguida de novas lavagens. A reação foi revelada pela adição de 100 µl/poço da solução de 3.3'5.5' tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida pela adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico (2 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450nm com correção a 570nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1β, IL-10 e TNF-α foi de 1.95 pg/ml, enquanto para IL-6 foi de 15.6 pg/ml.

4.8.4 Análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR)

A expressão gênica da enzima COX-1, COX-2 e TNF-α foram quantificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O músculo tibial anterior direito, após a remoção foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80 °C até o processamento. O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Gibco BRL, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Após tratamento com DNase, a síntese dos cDNAs foram processadas pelo método da transcriptase reversa empregando a enzima SuperScript (Invitrogen) a partir de 2 µg de RNA total e na presença de mistura de primers randômicos e oligo dT. Os experimentos de Real-Time PCR foram programados da seguinte maneira: 1 ciclo de desnaturação inicial de 10 min a 95 °C, e 40 ciclos de amplificação (30 seg de desnaturação a 95 °C e 1 min de anelamento e extensão a 60 °C); as sequências

dos primers que foram utilizados constam no trabalho de Wang *et al.* (2004). Os resultados foram interpretados usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct: número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo - background) que relaciona a expressão do gene de interesse comparado aquela do gene controle β -actina.

4.8.5 Análise da Expressão Protéica de COX-1 e COX-2 por Western-Blott

O conteúdo protéico no sobrenadante dos músculos após serem homogeneizados foi determinado através do método de Bradford empregando kit comercial (Bio Rad, EUA) e albumina de soro bovino para a construção da curva padrão.

Vinte e cinco microgramas de proteínas presentes nas amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Lauril Sulfato de Sódio (SDS – PAGE).

Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia, utilizando 150 mA por 2 horas), os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução de caseína à 2 %, preparada em tampão TBS-t (TRIS 20 mM + NaCl 137 mM contendo 0,1 % de Tween 20) por 1 hora. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primário específicos para COX-1 e COX-2 (monoclonal anti COX-1 e anti COX-2, de camundongo, 500ng/ml) por 12 horas em uma temperatura ambiente de 18 °C e após lavagem apropriada em TBS-t (6 lavagens de 10 minutos cada), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários (anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (1:3000, Bio Rad, EUA). As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens em TBS-t e as bandas imunoreativadas foram captadas por quimioluminescência (Lumiphos, Pierce, EUA). As imagens foram captadas mediante sistema Chemilmager (Alpha Innotech, EUA) e as intensidades das bandas (como medida do grau de expressão da proteína) foi determinada por

análise densitométrica. Um controle da quantidade de proteínas aplicadas em cada poço foi realizado corando-se a membrana com solução Ponceau 0,2 %. Os resultados de densitometria foram expressos em % em relação ao grupo controle (100 %).

4.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM e submetidos ao teste t-Student não pareado ou análise de variância (ANOVA) seguida da aplicação do teste *Student–Newman-Keuls* para múltiplas comparações. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Caracterização da curva de tempo relacionada com a lesão muscular induzida por alongamento passivo utilizando o corante azul de Evans para determinar o extravasamento plasmático no músculo tibial anterior de ratos Wistar.

A figura 9 demonstra o extravasamento do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos, em uma curva de tempo, após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Observamos um aumento estatisticamente significativo do grupo **Lesão 6h** (6.87 ± 1.47) quando comparado ao grupo **controle** (3.63 ± 0.50).

Figura 9 : Caracterização do extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 5$. (ANOVA, seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, ** $p < 0.01$. vs CONT).

Após determinarmos qual o tempo, onde tivemos o maior extravasamento plasmático, aplicamos o tratamento conforme descrito na metodologia.

Análise do Extravasamento Plasmático por azul de Evans após lesão e tratamento com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

A figura 10 demonstra o extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior em ratos nos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, Lesão, Lesão + Diclofenaco, Lesão + laser 1J, Lesão + laser 3J, Lesão + Laser 6J, Lesão + Laser 9J) no período de 6 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos um aumento estatisticamente significativo do extravasamento do grupo **lesão** (5.46 ± 1.09) quando comparado ao grupo **controle** (2.73 ± 0.43) com * $p < 0.05$.

Também podemos observar que o extravasamento plasmático dos grupos tratados com as diferentes doses de laser: **lesão + 1J** (2.61 ± 0.46), **lesão + 3J** (2.33 ± 0.13), **lesão + 6J** (2.92 ± 0.91) e **lesão + 9J** (2.80 ± 0.55) apresentaram uma redução estatisticamente significativa quando comparados ao grupo **Lesão** (5.46 ± 1.09) com # $p < 0.05$.

Figura 10 : Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo no período de 6 horas. Os dados representam a média ± EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, * $p < 0.05$ vs. CONT e # $p < 0.05$ vs. LESÃO).

Caracterização da curva de tempo dos níveis de Proteína C Reativa (PCR) relacionada com a lesão muscular induzida por alongamento passivo utilizando o corante azul de Evans para determinar o extravasamento plasmático no músculo tibial anterior de ratos Wistar

A figura 11 demonstra os níveis de Proteína C Reativa (PCR) no plasma de ratos, em uma curva de tempo, após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Observamos um aumento estatisticamente significativo do grupo **Lesão 6h** (1382.4 ± 153.60) com $***p<0.001$, **Lesão 12h** (883.20 ± 282.18) $**p<0.01$, **Lesão 24h** (640.00 ± 80.954) $**p<0.01$, quando comparado ao grupo **controle** (não detectado). Quando comparado os grupos lesionados foi observado um aumento significativo nos níveis de PCR no grupo **Lesão 6h** (1382.4 ± 153.60) quando comparado aos grupos **Lesão 12h** (883.20 ± 282.18) com $\#p<0.05$ e **Lesão 24h** (640.00 ± 80.954) com $##p<0.01$.

Figura 11 : Caracterização dos níveis de Proteína C Reativa plasma de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 5$. (ANOVA, seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, $*** p<0.001$ e $** p<0.01$ vs CONT, $\# p<0.05$ e $## p<0.01$ vs Lesão 6h).

Análise dos níveis de Proteína C Reativa após lesão e tratamento com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

Objetivando entender melhor a cinética da Lesão realizamos a avaliação da Proteína C Reativa em dois diferentes tempos.

A figura 12 demonstra os níveis de PCR no plasma de ratos nos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclofenaco, lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J), 6 horas após o protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de PCR quando comparamos o grupo **lesão** (1382.4 ± 153.6) com os grupos **controle** (**não detectado**) e **controle + 3J** (**não detectado**) com $***p<0.01$. Quando comparamos os grupos **lesão + Diclofenaco** (176.0 ± 50.5), **lesão + 1J** (96.0 ± 30.3), **+ 3J** (44.0 ± 4.0), **lesão + 6J** (172.8 ± 19.2) e **lesão + 9J** (512.0 ± 80.9) com o grupo **lesão** (1382.4 ± 153.6) observamos uma redução estatisticamente significativa nos níveis de proteína C reativa com $###p<0.01$ em todos estes grupos.

Figura 12 : Níveis de Proteína C Reativa (PCR) no plasma de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 6 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, $***p<0.01$ vs. CONT e CONT + 3J, $###p<0.01$ vs. LESÃO).

A figura 13 demonstra os níveis de PCR no plasma ratos nos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclofenaco, lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J), 12 horas após o protocolo de alongamento passivo. Podemos observar que o perfil de resposta foi muito semelhante ao observado após 6 horas do protocolo: um aumento estatisticamente significativo nos níveis de PCR no grupo **lesão** (883.2 ± 282.1) quando comparado aos grupos **controle (não detectado)** e **controle + 3J (não detectado)** com $***p < 0.001$ e uma redução estatisticamente significativa dos grupos **lesão + Diclofenaco** (52.0 ± 28.0), **lesão + 1J** (22.8 ± 7.2), **+ 3J** (11.0 ± 4.4), **lesão + 6J** (24.0 ± 5.3) e **lesão + 9J** (224.0 ± 32.0) quando comparados ao grupo **lesão** (883.2 ± 282.1) com $###p < 0.01$.

Figura 13 : Níveis de Proteína C Reativa (PCR) no plasma de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p < 0.01$ vs. CONT e CONT + 3J, $###p < 0.01$ vs. LESÃO).

Análise dos níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no músculo tibial anterior de ratos 12 horas após o protocolo de alongamento passivo, tratados com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

A figura 14 demonstra os níveis de TNF- α no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclofenaco, lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J), 12 horas após o protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de TNF- α quando comparamos o grupo **lesão** (846.60 ± 34.256) com os grupos **controle** (187.20 ± 39.047) e **controle + 3J** (246.25 ± 58.652) com *** $p < 0.001$. Quando comparamos os grupos **lesão + Diclofenaco** (99.200 ± 32.146), **lesão + 1J** (106.00 ± 24.389), **+ 3J** (193.00 ± 51.143), **lesão + 6J** (167.20 ± 33.343) e **lesão + 9J** (158.50 ± 25.198) com o grupo **lesão** (846.60 ± 34.256) observamos uma redução estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α com ### $p < 0.001$ em todos estes grupos.

Figura 14 : Níveis de TNF- α em músculo tibial anterior de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 5$. (ANOVA, seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, *** $p < 0.001$ vs. CONT e CONT + 3J, ### $p < 0.001$ vs. LESÃO).

A figura 15 demonstra os níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclofenaco, lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J), 12 horas após o protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-1 β quando comparamos o grupo **lesão** (4233.8 $\pm$ 140.64) com os grupos **controle** (1191.8 $\pm$ 202.12) e **controle + 3J** (1288.0 $\pm$ 158.59) com ***p<0.001. Quando comparamos os grupos **lesão + Diclofenaco** (1055.6 $\pm$ 142.80), **lesão + 1J** (708.40 $\pm$ 173.66), **+ 3J** (1034.0 $\pm$ 243.89), **lesão + 6J** (949.00 $\pm$ 182.53) e **lesão + 9J** (979.20 $\pm$ 94.445) com o grupo **lesão** (4233.8 $\pm$ 140.64) observamos uma redução estatisticamente significativa nos níveis de IL-1 β com ###p<0.001 em todos estes grupos.

Figura 15 : Níveis de IL-1 β em músculo tibial anterior de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, ***p<0.001 vs. CONT e CONT + 3J, ###p<0.001 vs. LESÃO).

A figura 16 demonstra os níveis de IL-6 no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclofenaco, lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J), 12 horas após o protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-6 quando comparamos o grupo **lesão** (1329.3 ± 112.46) com os grupos **controle** (351.67 ± 23.253) e **controle + 3J** (439.33 ± 55.659) com $***p<0.001$. Quando comparamos os grupos **lesão + Diclofenaco** (828.50 ± 226.24), **lesão + 1J** (390.50 ± 68.921), **+ 3J** (324.50 ± 12.168), **lesão + 6J** (348.57 ± 29.661) e **lesão + 9J** (401.00 ± 27.492) com o grupo **lesão** (1329.3 ± 112.46) observamos uma redução estatisticamente significativa nos níveis de IL-6 com $###p<0.001$ em todos estes grupos.

Figura 16 : Níveis de IL-6 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 5$. (ANOVA, seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, $***p<0.001$ vs. CONT e CONT + 3J, $###p<0.001$ vs. LESÃO).

A figura 17 demonstra os níveis de IL-10 no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclofenaco, lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J), 12 horas após o protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-10 quando comparamos o grupo **lesão** (2753.0 ± 351.37) com os grupos **controle** (429.75 ± 132.44) e **controle + 3J** (366.25 ± 189.94) com $***p<0.001$. Quando comparamos os grupos **lesão + Diclofenaco** (231.40 ± 77.024), **lesão + 1J** (317.75 ± 94.204), **+ 3J** (600.60 ± 179.13), **lesão + 6J** (303.40 ± 60.024) e **lesão + 9J** (447.00 ± 127.24) com o grupo **lesão** (2753.0 ± 351.37) observamos uma redução estatisticamente significativa nos níveis de IL-10 com $###p<0.001$ em todos estes grupos.

Figura 17 : Níveis de IL-10 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após o protocolo de alongamento passivo no período de 12 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 5$. (ANOVA, seguido do teste *Student-Newman-Keuls*, $***p<0.001$ vs. CONT e CONT + 3J, $###p<0.001$ vs. LESÃO).

Caracterização da curva de tempo relacionada à lesão muscular induzida por alongamento passivo utilizando a técnica de PCR Real Time para determinar a quantificação da expressão gênica de COX-1 no músculo tibial anterior de ratos Wistar

A figura 18, demonstra a quantificação da expressão gênica de COX-1 no músculo tibial anterior de ratos em diferentes tempos, onde observou-se um aumento estatisticamente significativo no grupo **lesão 12h** (1.98 ± 0.26) quando comparado com o grupo **controle hígido** (1.02 ± 0.09) com $**p < 0.01$.

Figura 18 : Quantificação da expressão gênica de COX-1 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 4$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p < 0,01$ vs. CONT).

Caracterização da curva de tempo relacionada à lesão muscular induzida por alongamento passivo utilizando a técnica de PCR Real Time para determinar a quantificação da expressão gênica de COX-2 no músculo tibial anterior de ratos Wistar

A figura 19, demonstra a quantificação da expressão gênica de COX-2 no músculo tibial anterior de ratos em diferentes tempos, onde observou-se um aumento estatisticamente significativo no grupo **lesão 6h** (1.73 ± 0.32) quando comparado ao grupo **controle hígido** (1.02 ± 0.08) com $*p < 0.05$.

Figura 19 : Quantificação da expressão gênica de COX-2 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes tempos. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 4$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $*p < 0.05$ vs. CONT).

Quantificação da expressão gênica de COX-1 e COX-2 após lesão e tratamento com Terapia Laser de Baixa Potência.

Conforme mostrado na figura 18 o pico máximo de expressão gênica para COX-1 foi de 12 horas após a indução da lesão. Analisamos então, a expressão gênica de COX-1, nesse período, em grupos lesionados submetidos as diferentes doses de laser (1J, 3J, 6J e 9J).

A figura 20, demonstra que a expressão gênica da COX-1 no músculo tibial anterior em ratos nos diferentes grupos (controle, controle +3J, lesão, lesão + 1J, lesão + 3J, lesão + 6J) aonde foi observado um aumento estatisticamente significativo da expressão do grupo **lesão** (1.86 ± 0.22) quando comparado ao grupo **controle** (0.99 ± 0.11) com $**p < 0.01$ e um aumento da expressão do grupo **controle + 3J** (1.64 ± 0.11) comparado ao grupo **controle** (0.99 ± 0.11) com $^{\#}p < 0.05$. Quando comparado o grupo **lesão + 1J** (2.50 ± 0.19) aos grupos **lesão** (1.86 ± 0.22), **lesão + 9J** (1.90 ± 0.07) com $^*p < 0.05$, **lesão + diclofenaco** (1.39 ± 0.12), **lesão + 3J** (1.07 ± 0.16), **lesão + 6J** (1.31 ± 0.17) com $***p < 0.001$, e quando comparamos o grupo **lesão + 9J** (1.90 ± 0.07) ao grupo **lesão + 3J** (1.07 ± 0.16) com $^{\#\#}p < 0.01$, foi observado um aumento significativo da expressão da COX-1.

Figura 20 : Quantificação da expressão gênica de COX-1 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média ± EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, **p<0.01, #p<0.05 vs. CONT, *p<0.05 vs. LESÃO, ***p<0.001 vs. LESÃO + DICLOFENACO, LESÃO + 3J, LESÃO + 6J, ^{XX}p<0.01 vs LESÃO + 3J).

Conforme mostrado na figura 19 o pico máximo de expressão gênica para COX-2 foi de 6 horas após a indução da lesão. Analisamos então, a expressão gênica de COX-2, nesse período, em grupos lesionados submetidos às diferentes doses de laser (1J, 3J, 6J e 9J). Processamos um grupo tratado com diclofenaco (1 mg/kg I.V).

A figura 21, demonstra a quantificação da expressão de COX-2 no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, Lesão, Lesão + laser 1J, Lesão + laser 3J, Lesão + Laser 6J no período de 6 horas após protocolo de alongamento passivo, aonde foi observado um aumento estatisticamente significativo da expressão de COX-2 do grupo **lesão** (1.838 ± 0.2105) quando comparado ao grupo **controle** (1.01 ± 0.09) com $*p<0.05$ e do grupo **laser + 1J** (2.60 ± 0.21) quando comparado aos grupos **lesão** (1.83 ± 0.21) e **lesão + diclofenaco** (1.65 ± 0.17) com $^{\#}p<0.05$.

Figura 21 : Quantificação da expressão gênica de COX-2 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 6 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média ± EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $*p<0.05$ vs. CONT, com $^{\#}p<0.05$ vs. LESÃO E LESÃO + DICLOFENACO).

Quantificação do TNF- α após lesão e tratamento com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

A figura 22 , demonstra a quantificação de TNF- α por PCR em tempo real no músculo tibial anterior de ratos dos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, Lesão, Lesão + laser 1J, Lesão + laser 3J, Lesão + Laser 6J no período de 6 horas após protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de TNF- α no grupo **lesão** (1.38 ± 0.04) quando comparado aos grupos **controle** (0.92 ± 0.04) e **controle + 3J** (0.83 ± 0.07) com $**p < 0.01$. Quando comparamos os grupos **lesão + diclofenaco** (0.55 ± 0.14), **lesão + 1J** (0.78 ± 0.13) e **lesão + 6J** (0.79 ± 0.05) com $^{##}p < 0,01$, e os grupos **lesão + 3J** (0.86 ± 0.13) e **lesão + 9J** (0.89 ± 0.13) com $*p < 0.05$ observamos uma redução estatisticamente significativa do TNF- α em relação ao grupo **lesão** (1.38 ± 0.04).

Figura 22 : Quantificação de TNF- α por PCR em tempo real em músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes grupos no período de 6 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 5. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p < 0.01$ vs. CONT e CONT+ 3J, $^{##}p < 0,01$ e $*p < 0.05$ vs. LESÃO).

Caracterização da curva de tempo relacionada à lesão muscular induzida por alongamento passivo utilizando a técnica de Western blot para determinar a quantificação da expressão protéica de COX-1 no músculo tibial anterior de ratos Wistar

(A)

(B)

Figura 23 : Resultado de membrana representativa da curva temporal da expressão protéica de COX-1 (técnica de Western Blotting). N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Expressão Protéica COX-1).

Caracterização da curva de tempo relacionada à lesão muscular induzida por alongamento passivo utilizando a técnica de Western blot para determinar a quantificação da expressão protéica de COX-2 no músculo tibial anterior de ratos Wistar

(A)

(B)

Figura 24 : Resultado de membrana representativa da curva temporal da expressão protéica de COX-2 (técnica de Western Blotting). N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Expressão Protéica COX-2).

Quantificação da expressão protéica de COX-1 e COX-2 após lesão e tratamento com Terapia Laser de Baixa Potência.

Conforme mostrado na figura 25 o pico máximo de expressão protéica para COX-1 foi de 12 horas após a indução da lesão. Analisamos então, a expressão protéica de COX-1, nesse período, em grupos lesionados submetidos as diferentes doses de laser (1J, 3J, 6J e 9J).

(A)

(B)

Figura 25 : Resultado de membrana representativa da expressão protéica de COX-1 (técnica de Western Blotting) dos grupos tratados. N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Expressão Protéica COX-1).

Conforme mostrado na figura 26 o pico máximo de expressão protéica para COX-2 foi de 12 horas após a indução da lesão. Analisamos então, a expressão protéica de COX-2, nesse período, em grupos lesionados submetidos as diferentes doses de laser (1J, 3J, 6J e 9J).

(A)

(B)

Figura 26 : Resultado de membrana representativa da expressão protéica de COX-1 (técnica de Western Blotting) dos grupos tratados. N = 4 animais/grupo. (A) Membrana representativa (B) Densitometria. (Técnica de Western Blotting – Expressão Protéica COX-2).

Quantificação da IL 10 após lesão e tratamento com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

A figura 27 , demonstra a quantificação de IL 10 por PCR em tempo real no músculo tibial anterior de ratos dos diferentes grupos (controle, controle + laser 3J, Lesão, Lesão + laser 1J, Lesão + laser 3J, Lesão + Laser 6J no período de 6 horas após protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL 10 no grupo **lesão** (1.69 ± 0.06) quando comparado aos grupos **controle** (0.96 ± 0.02) e **controle + 3J** (0.86 ± 0.10) com $**p < 0.01$. Quando comparamos o grupo **lesão + 3J** (1.20 ± 0.13) com o grupo **lesão** (1.69 ± 0.06) observamos uma redução estatisticamente significativa da IL 10 com $*p < 0,05$.

Figura 27 : Quantificação de IL 10 por PCR em tempo real em músculo tibial anterior de ratos Wistar após protocolo de alongamento passivo em diferentes grupos no período de 6 horas. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 5$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p < 0.001$ vs. CONT e CONT+ 3J, $###p < 0,001$ vs.LESÃO).

Caracterização da curva de tempo relacionada com a lesão muscular induzida por alongamento passivo na avaliação do Índice Funcional pelo teste Walking Track através do cálculo do SFI (sciatic function index) .

A figura 28, demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (controle, lesão 6h, lesão 12h e lesão 24 h), onde observou-se através do índice funcional uma dificuldade de deambulação dos animais do grupo **lesão 6h (15.89 ± 1.02)** e **lesão 12h (15.53 ± 1.47)** quando comparado ao grupo **controle (-4.81 ± 3.12)** com $***p < 0.001$. E ao compararmos o grupo **lesão 24h (6.00 ± 2.32)** ao grupo **controle (-4.81 ± 3.12)** observamos uma redução significativa, com $^{##}p < 0.01$.

Figura 28 : Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, lesão 6h, lesão 12h e lesão 24 h. Os dados representam a média ± EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p < 0.001$ vs. CONT, $^{##}p < 0.01$ vs. CONT).

Avaliação funcional pós lesão e tratamento com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

Conforme mostrado na figura 29 a maior dificuldade de dambulação dos animais foi no período de 6 horas e 12 horas após a indução da lesão. Analisamos então, o índice funcional no período de 12 horas, uma vez que não houve diferença entre os dois tempos, essa análise foi realizada nos grupos lesionados submetidos as diferentes doses de laser (1J, 3J, 6J e 9J). Também avaliamos um grupo tratado com diclofenaco (1 mg/kg I.V).

A Figura 29, demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclo, lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J), onde observamos que o índice funcional apresentou um aumento estatisticamente significativo na dificuldade de deambulação dos animais do grupo **Lesão (40.99 ± 10.81)** quando comparados aos grupos **Controle (-1.84 ± 1.66)** e **Controle + Laser 3J (2.74 ± 1.14)** com $***p < 0.001$. No entanto, observamos que houve uma melhora estatisticamente significativa na deambulação dos animais dos grupos **Lesão + Diclofenaco (16.14 ± 3.14)**, **Lesão + Laser 1J (5.81 ± 3.12)**, **Lesão + Laser 3J (-0.43 ± 1.65)**, **Lesão + Laser 6J (4.86 ± 3.27)** quando comparados ao grupo Lesão, com $###p < 0.001$.

Figura 29 : Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + diclo., lesão + laser 1J, lesão + laser 3J, lesão + laser 6J, lesão + laser 9J. Os dados representam a média ± EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0,001 vs. CONT e CONT+3J, ###p<0,001 vs. LESÃO).

Avaliação funcional pós lesão e tratamento com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

Analizamos o índice funcional no período de 6 horas, essa análise foi realizada nos grupos lesionados submetidos a Terapia Laser de Baixa Intensidade utilizando a energia de 3J. Também avaliamos um grupo tratado com diclofenaco (1 mg/kg I.V) e um grupo tratado com dexametasona (1 mg/kg I.V).

A Figura 30, demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão+ dexta, lesão + diclo, lesão + laser 3J), onde observamos que o índice funcional apresentou um aumento estatisticamente significativo na dificuldade de deambulação dos animais do grupo **Lesão** (26.45 ± 5.15) quando comparados aos grupos **Controle** (0.00 ± 0.00) e **Controle + Laser 3J** (3.30 ± 1.71) com $***p < 0.001$. No entanto, observamos que houve uma melhora estatisticamente significativa na deambulação dos animais dos grupos **Lesão + Dexametasona** (3.09 ± 1.13), **Lesão + Diclofenaco** (5.52 ± 1.43), **Lesão + Laser 3J** (3.40 ± 2.29) quando comparados ao grupo Lesão, com $###p < 0.001$.

Figura 30 : Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média ± EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, ***p<0,001 vs. CONT e CONT+3J, ### p<0,001 vs. LESÃO).

Analizamos o índice funcional no período de 12 horas, essa análise foi realizada nos grupos lesionados submetidos a Terapia Laser de Baixa Potência utilizando a energia de 3J. Também avaliamos um grupo tratado com diclofenaco (1 mg/kg I.V) e um grupo tratado com dexametasona (1 mg/kg I.V).

A Figura 31, demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão+ dexta, lesão + diclo, lesão + laser 3J), onde observamos que o índice funcional apresentou um aumento estatisticamente significativo na dificuldade de deambulação dos animais do grupo **Lesão** (28.62 ± 1.21) quando comparados aos grupos **Controle** (0.00 ± 0.00) e **Controle + Laser 3J** (2.74 ± 1.14) com $***p<0.001$. No entanto, observamos que houve uma melhora estatisticamente significativa na deambulação dos animais dos grupos **Lesão + Dexametasona** (14.20 ± 5.79) com $*p<0.05$, **Lesão + Diclofenaco** (16.14 ± 3.14) com $**p<0.01$, **Lesão + Laser 3J** (0.00 ± 0.00) quando comparados ao grupo Lesão, com $###p<0.001$.

Figura 31 : Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p<0,001$ vs. CONT e CONT+3J, $**p<0,001$, $*p<0,05$, $###p<0,001$ vs. LESÃO).

Analizamos o índice funcional no período de 24 horas, essa análise foi realizada nos grupos lesionados submetidos a Terapia Laser de Baixa Potência utilizando a energia de 3J. Também avaliamos um grupo tratado com diclofenaco (1 mg/kg I.V) e um grupo tratado com dexametasona (1 mg/kg I.V).

A Figura 32, demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão+ dexta, lesão + diclo, lesão + laser 3J), onde observamos que o índice funcional apresentou um aumento estatisticamente significativo na dificuldade de deambulação dos animais do grupo **Lesão** (12.15 ± 1.05) quando comparados aos grupos **Controle** (0.00 ± 0.00) e **Controle + Laser 3J** (0.00 ± 0.00) com $***p < 0.001$. No entanto, observamos que houve uma melhora estatisticamente significativa na deambulação dos animais dos grupos **Lesão + Dexametasona** (0.00 ± 0.00), **Lesão + Diclofenaco** (0.00 ± 0.00), **Lesão + Laser 3J** (0.00 ± 0.00) quando comparados ao grupo Lesão, com $###p < 0.001$.

Figura 32 : Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p < 0,001$ vs. CONT e CONT+3J, $###p < 0,001$ vs. LESÃO).

Analizamos o índice funcional no período de 48 horas, essa análise foi realizada nos grupos lesionados submetidos a Terapia Laser de Baixa Potência utilizando a energia de 3J. Também avaliamos um grupo tratado com diclofenaco (1 mg/kg I.V) e um grupo tratado com dexametasona (1 mg/kg I.V).

A Figura 33, demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão+ dexta, lesão + diclo, lesão + laser 3J), onde observamos que o índice funcional apresentou um aumento estatisticamente significativo na dificuldade de deambulação dos animais do grupo **Lesão** (8.87 ± 12.79) quando comparados aos grupos **Controle** (0.00 ± 0.00) e **Controle + Laser 3J** (0.00 ± 0.00) com $***p < 0.001$. No entanto, observamos que houve uma melhora estatisticamente significativa na deambulação dos animais dos grupos **Lesão + Dexametasona** (0.00 ± 0.00), **Lesão + Diclofenaco** (0.00 ± 0.00), **Lesão + Laser 3J** (0.00 ± 0.00) quando comparados ao grupo Lesão, com $###p < 0.001$.

Figura 33 : Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p < 0,001$ vs. CONT e CONT+3J, $###p < 0,001$ vs. LESÃO).

Analizamos o índice funcional no período de 72 e 96 horas, essa análise foi realizada nos grupos lesionados submetidos a Terapia Laser de Baixa Potência utilizando a energia de 3J. Também avaliamos um grupo tratado com diclofenaco (1 mg/kg I.V) e um grupo tratado com dexametasona (1 mg/kg I.V).

As Figuras 34 e 35, demonstram o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (controle, controle + laser 3J, lesão, lesão+ dexta, lesão + diclo, lesão + laser 3J), onde não foi observado nenhuma diferença estatística entre os grupos.

Figura 34 : Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média ± EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls).

Figura 35 : Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos controle, controle + laser 3J, lesão, lesão + dexta, lesão + diclo., lesão + laser 3J,. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls).

Efeito da contração tetânica em estimulação indireta em músculo tibial de ratos pós lesão e tratamento com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

A contração tetânica foi induzida através do aumento da frequência de 0,2 Hz para 60 Hz (LABAT *et al.*, 2002).

A figura 36 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica na primeira tetania em protocolo de 6 horas, no qual foi observado uma redução estatisticamente significativa dessa força de contração no grupo **lesão** (71.34 ± 4.27) quando comparado aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (112.78 ± 8.01) com $**p < 0.01$. Nos grupos tratados tanto com diclofenaco quanto com a laserterapia não foi observado nenhum ganho de força de contração significativa.

Figura 36 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta a cada 10 minutos, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p < 0,01$ vs. CONT e CONT+3J).

A figura 37 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica durante três tetanias em protocolo de 6 horas, aonde foi comparado os grupos lesão, lesão + diclofenaco e lesão + 1J. Não foi observado nenhum ganho de força de contração muscular nos grupos tratados quando comparados ao grupo lesão.

Figura 37 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta a cada 5 minutos, no total de 3 contrações tetânicas em animais controle e tratados. Os grupos tratados com a laserterapia não apresentaram resultados significativos.

A figura 38 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica na primeira tetania em protocolo de 12 horas, aonde foi observado uma redução da força de contração no grupo **lesão** (63.45 ± 4.89) quando comparado ao grupo **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle** (98.00 ± 8.78) com $*p < 0.05$. No entanto, um ganho na força de contração muscular foi observado nos grupos tratados, **lesão + diclofenaco** (124.39 ± 6.06), **lesão + 1J** (109.93 ± 5.78) e **lesão + 3J** (105.49 ± 10.97) versus o grupo **lesão** (63.45 ± 4.89) com $^{##}p < 0.01$.

Figura 38 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta a cada 10 minutos, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $*p < 0,05$ vs. CONT e CONT+3J e $^{##}P < 0,01$ vs. LESÃO).

A figura 39 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica em protocolo de 12 horas, aonde foi observado na primeira tetania um ganho significativo na intensidade da força de contração no grupo **lesão + diclofenaco** (124.39 ± 6.06) com $**p<0.01$, o grupo **grupo lesão + 3J** (105.49 ± 10.97) com $*p<0.05$ e em relação ao **grupo lesão + 9J** (91.38 ± 9.08) com $^{\#}p<0.05$ versus o **grupo lesão** (63.45 ± 4.89). Na segunda tetania foi observado um ganho significativo na intensidade da força de contração nos grupos **lesão + diclofenaco** (118.35 ± 6.064) e **lesão + 9J** (113.48 ± 8.030) com $**p<0.01$ e $^{\#}p<0.05$, respectivamente quando comparados ao grupo **lesão** (71.633 ± 9.823). Na terceira tetania foi observado um ganho significativo na intensidade da força de contração nos grupos **lesão + diclofenaco** (109.85 ± 6.503) **lesão + 3J** (102.64 ± 8.521) e **lesão + 9J** (101.60 ± 3.36) quando comparados ao grupo **lesão** (65.68 ± 5.13) com $**p<0.01$, $*p<0.05$ e $^{\#}p<0.05$, respectivamente. Os demais grupos tratados com a laserterapia não apresentaram resultados significativos.

Figura 39 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta a cada 10 minutos, no total de 3 contrações tetânicas em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania $**p<0.01$, $*p<0.05$ vs. LESÃO e $^{\#}p<0.05$ vs. LESÃO + 9J, 2ª tetania $*p<0.01$ e $^{\#}p<0.05$ vs. LESÃO, 3ª tetania $**p<0.01$, $*p<0.05$ e $^{\#}p<0.05$ vs. LESÃO).

A figura 40 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante a primeira tetania em protocolo de 6 horas no grupo **lesão + 3J** (127.30 ± 13.43) versus o grupo **lesão** (89.980 ± 5.396) com $*p<0.05$ e quando comparado ao grupo **lesão + 9J** (148.55 ± 8.63) versus o grupo **lesão** (89.98 ± 5.39) com $^{##}p<0.01$.

Figura 40 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $*p<0,05$ e $^{##}p<0,01$ vs. LESÃO)

A figura 41 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante a primeira tetania, em protocolo de 6 horas, quando comparado o grupo **lesão + 9J** (148.55 ± 8.63) aos grupos **lesão** (89.98 ± 5.39) e **lesão + diclofenaco** (96.07 ± 3.48) com $**p<0.01$ respectivamente. Na segunda tetania foi observado um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima quando comparado o grupo **lesão + 9J** (218.77 ± 20.39) aos grupos **lesão** (112.75 ± 6.40) **lesão + diclofenaco** (112.39 ± 4.53) e **lesão + 3J** (125.75 ± 9.85) com $***p < 0.001$ respectivamente. Na terceira tetania foi observado um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima quando comparado o grupo **lesão + 9J** (171.36 ± 11.23) aos grupos **lesão** (114.43 ± 4.51) e **lesão + diclofenaco** (132.09 ± 3.18) com $**p<0.01$ e $*p<0.05$ respectivamente.

Figura 41 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania $**p<0.01$ vs. LESÃO e LESÃO + DICLOFENACO, 2ª tetania $***p<0.001$ vs. LESÃO, LESÃO + DICLOFENACO e LESÃO + 3J, 3ª tetania $*p<0.05$ vs. LESÃO + DICLOFENACO e $**p<0.01$ vs. LESÃO).

A figura 42 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante a primeira tetania em protocolo de 12 horas quando comparado o grupo **lesão + 9J** (125.44 ± 7.57) ao **grupo lesão** (75.97 ± 10.07) com $p < 0.05$.

Figura 42 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$ vs. LESÃO).

A figura 43 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante a primeira tetania, em protocolo de 12 horas, quando comparado o grupo **lesão + 9J** (125.44 ± 7.57) ao grupo **lesão** (75.97 ± 10.07) com $*p<0.05$. Na segunda tetania foi observado um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima quando comparado o grupo **+ 9J** (125.44 ± 7.57) aos grupos **lesão** (74.07 ± 8.11) , **lesão + diclofenaco** (98.69 ± 7.51) e **+ 3J** (114.09 ± 8.20) com $***p<0.001$, $##p<0.01$ e $*p<0.05$ respectivamente. Na terceira tetania foi observado um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima quando comparado o grupo **lesão + 9J** (129.58 ± 9.74) ao grupo **lesão** (72.28 ± 4.59) com $**p<0.01$, e o grupo **lesão + 3J** (120.43 ± 11.63) ao grupo **lesão** (72.28 ± 4.59) com $*p<0.05$.

Figura 43 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania $*p<0.05$ vs. LESÃO, 2ª tetania $***p<0.001$ vs. LESÃO, $##p<0.01$ vs. LESÃO + DICLOFENACO e $*p<0.05$ vs. LESÃO + 3J, 3ª tetania $**p<0.01$ e $*p<0.05$ vs. LESÃO).

A figura 44 demonstra uma redução da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima na primeira tetania, em protocolo de 6 horas, quando comparado o grupo **lesão** (62.18 ± 6.12) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (84.89 ± 7.37) com $**p<0.01$ respectivamente. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo da: Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (88.97 ± 7.83), **lesão + 1J** (90.67 ± 6.24), **lesão + 3J** (89.45 ± 5.78) e **lesão + 9J** (91.36 ± 7.65) ao grupo **lesão** (62.18 ± 6.12) com $*p<0.05$ e $^{\#}p<0.05$ respectivamente.

Figura 44 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p<0.01$ vs. CONT E CONT +3J, $*p<0.05$ e $^{\#}p<0.05$ vs. LESÃO).

A figura 45 demonstra um aumento significativo na primeira tetania da : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima em protocolo de 6 horas na primeira tetania quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (88.97 ± 7.83), **lesão + 3J** (89.45 ± 5.78) e **lesão + 9J** (91.36 ± 7.65) ao grupo **lesão** (62.18 ± 6.12) com $^*p<0.05$, $^x p<0.05$ e $^\# p<0.05$ respectivamente. Na segunda tetania não foi observado nenhum dado significativo. Na terceira tetania foi observado um aumento significativo da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (129.83 ± 19.18) e **lesão + 1J** (121.48 ± 12.56) ao grupo **lesão** (78.01 ± 5.55) com $^*p<0.05$ e $^\# p<0.05$ respectivamente.

Figura 45 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania $^*p<0.05$, $^x p<0.05$ e $^\# p<0.05$ vs. LESÃO, 3ª tetania $^*p<0.05$ vs. LESÃO).

A figura 46 demonstra uma redução da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima na primeira tetania em protocolo de 12 horas quando comparado o grupo **lesão** (45.37 ± 4.72) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (97.46 ± 18.51) com $**p < 0.01$. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (83.75 ± 3.23), **lesão + 1J** (84.15 ± 7.41) e **lesão + 3J** (76.46 ± 10.18) ao grupo **lesão** (45.37 ± 4.72) com $^{\#}p < 0.05$ e quando comparado o grupo **lesão + 9J** (96.80 ± 9.75) ao grupo **lesão** (45.37 ± 4.72) com $^{xx}p < 0.01$.

Figura 46 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p < 0.01$ vs. CONT E CONT +3J, $^{\#}p < 0.05$ e $^{xx}p < 0.01$ vs. LESÃO).

A figura 47 demonstra um aumento significativo na primeira tetania da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima em protocolo de 12 horas quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco (83.75 ± 3.23) e lesão + 9J (96.80 ± 9.75)** ao grupo **lesão (45.37 ± 4.72)** com $*p<0.05$ e $^{##}p<0.01$ respectivamente. Na segunda tetania foi observado um aumento significativo da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco (75.09 ± 3.20), lesão + 3J (90.39 ± 7.81) e lesão + 9J (100.67 ± 7.90)** ao grupo **lesão (32.62 ± 3.22)** com $^{**}p<0.01$, $^{xx}p<0.01$ e $^{##}p<0.01$ respectivamente. Na terceira tetania foi observado um aumento significativo da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco (80.10 ± 4.43), lesão + 3J (89.59 ± 2.69) e lesão + 9J (106.45 ± 7.27)** ao grupo **lesão (40.08 ± 3.74)** com $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.01$ e $^{##}p<0.01$ respectivamente.

Figura 47 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, 1ª tetania * $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ vs. LESÃO, 2ª tetania ** $p < 0.01$, XX $p < 0.01$ e ## $p < 0.01$ vs. LESÃO, 3ª tetania ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ vs. LESÃO).

Efeito da contração tetânica em estimulação indireta em músculo tibial de ratos pós lesão e tratamento com Terapia Laser de Baixa Potência, Dexametasona e Diclofenaco.

A figura 48 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica em protocolo de 6 horas, aonde foi observado uma redução da força de contração no grupo **lesão** (74.22 ± 4.26) quando comparado ao grupo **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (104.05 ± 6.41) com $*p < 0.05$. No entanto, um ganho na força de contração muscular foi observado no grupo tratado, **lesão + 3J** (92.52 ± 3.11) versus o grupo **lesão** (74.22 ± 4.26) com $^{\#}p < 0.05$.

Figura 48 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $*p < 0,05$ vs. CONT e CONT+3J, $^{\#}p < 0,05$).

A figura 49 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica em protocolo de 12 horas, aonde foi observado uma redução da força de contração no grupo **lesão** (58.56 ± 5.90) quando comparado ao grupo **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (105.29 ± 4.81) com $**p<0.01$. No entanto, um ganho na força de contração muscular foi observado nos grupos tratados, **lesão + dexametasona** (94.40 ± 4.47), **lesão + diclofenaco** (103.99 ± 3.21), **lesão + 3J** (102.54 ± 14.08) versus o grupo **lesão** (58.56 ± 5.90) com $^{##}p<0.01$.

Figura 49 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p<0,01$ vs. CONT e CONT+3J e $^{##}P<0,01$ vs. LESÃO).

A figura 50 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica em protocolo de 24 horas, aonde foi observado uma redução da força de contração no grupo **lesão** (74.77 ± 1.56) quando comparado ao grupo **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (85.58 ± 6.17) com $**p<0.01$. No entanto, um ganho na força de contração muscular foi observado nos grupos tratados, **lesão + dexametasona** (93.165 ± 2.77), **lesão + diclofenaco** (97.02 ± 2.97), **lesão + 3J** (95.72 ± 5.05) versus o grupo **lesão** (74.77 ± 1.56) com $^{##}p<0.01$.

Figura 50 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p<0,01$ vs. CONT e CONT+3J e $^{##}P<0,01$ vs. LESÃO).

A figura 51 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica em protocolo de 48 horas, aonde não foi observado nenhuma diferença significativas entre os grupos

Figura 51 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls).

A figura 52 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica em protocolo de 72 horas, aonde foi observado uma redução da força de contração no grupo **lesão** (99.07 ± 0.463) quando comparado ao grupo **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (116.93 ± 4.24) com $**p < 0.01$. No entanto, um ganho na força de contração muscular foi observado no grupo, **lesão + dexametasona** (108.92 ± 2.70) versus o grupo **lesão** (99.07 ± 0.463) com $^x p < 0.05$ e nos grupos **lesão + diclofenaco** (114.96 ± 2.62), **lesão + 3J** (117.77 ± 0.99) versus o grupo **lesão** (99.07 ± 0.46) com $^{##} p < 0.01$.

Figura 52 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p < 0,01$ vs. CONT e CONT+3J e $^{##}P < 0,01$ e $^x p < 0,05$ vs. LESÃO).

A figura 53 demonstra a intensidade da força de contração muscular por estimulação elétrica em protocolo de 96 horas, aonde não foi observado nenhuma diferença significativas entre os grupos.

Figura 53 : Intensidade da força de contração muscular induzida por estimulação elétrica indireta, no total de 1 contração tetânica em animais controle e tratados. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls).

A figura 54 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima em protocolo de 6 horas no grupo **lesão + 3J** (108.76 ± 3.71) versus o grupo **lesão** (80.71 ± 4.64) com $*p < 0.05$.

Figura 54 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$, (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $*p < 0,05$ vs. LESÃO).

A figura 55 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante em protocolo de 12 horas, aonde foi observado uma redução da força de contração no grupo **lesão** (25.43 ± 8.85) quando comparado ao grupo **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (88.55 ± 12.56) com $**p < 0.01$. Nos demais grupos tratados não foi observado diferenças significativas em relação ao grupo **lesão** (25.43 ± 8.85).

Figura 55 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, , $**p < 0,01$ vs. CONT e CONT+3J).

A figura 56 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante em protocolo de 24 horas quando comparado o grupo **lesão** (61.88 ± 2.38) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (150.68 ± 7.75) com $**p<0.01$ e $***p<0.001$ respectivamente. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (92.18 ± 9.68) e **+ 3J** (89.97 ± 1.79) com $^{##}p<0.05$ quando comparado ao grupo **lesão** (61.88 ± 2.38).

Figura 56 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p<0.01$ e $***p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J, $^{##}p<0.05$ vs. LESÃO).

A figura 57 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante em protocolo de 48 horas quando comparado o grupo **lesão** (41.48 ± 7.82) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (102.44 ± 6.47) com $***p < 0.001$. Em relação aos grupos tratados não foi observado nenhuma diferença significativa.

Figura 57 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p < 0.001$ vs. CONT E CONT +3J,).

A figura 58 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante em protocolo de 72 horas quando comparado o grupo **lesão** (66.82 ± 7.40) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (105.58 ± 11.06) com $**p<0.01$. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + 3J** (120.10 ± 4.73) versus os grupos **lesão + dexametasona** (61.88 ± 2.38) e **lesão** (66.82 ± 7.40) com $***p<0.001$ e **lesão + diclofenaco** (88.89 ± 7.57) com $^{\#}p<0.05$ e quando comparado o grupos **lesão + diclofenaco** (88.89 ± 7.57) versus os grupos **lesão** (66.82 ± 7.40) e **lesão + dexametasona** (61.88 ± 2.38) com $^*p<0.05$.

Figura 58 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p<0.01$ vs. CONT E CONT +3J, $^*p<0.05$ vs. LESÃO E DEXA, $***p<0.001$ vs. LESÃO, DEXA e DICL e $^*p<0.05$ vs DICL).

A figura 59 demonstra um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima durante em protocolo de 96 horas quando comparado o grupo **lesão** (45.53 ± 4.27) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (95.20 ± 7.83) com $***p < 0.001$. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo no tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (103.34 ± 8.95) e grupo **lesão + 3J** (87.01 ± 2.77) versus o grupo **lesão** (45.53 ± 4.27) com $^{xxx}p < 0.001$ e $^{###}p < 0.001$ respectivamente.

Figura 59 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p < 0.001$ vs. CONT E CONT +3J e $^{xxx}p < 0.001$ e $^{###}p < 0.001$ vs. LESÃO).

A figura 60 demonstra uma redução da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima em protocolo de 6 horas, quando comparado o grupo **lesão** (27.65 ± 4.79) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (67.27 ± 3.43) com $***p<0.001$ respectivamente. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo da: Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + dexametasona** (74.05 ± 4.03), **lesão + diclofenaco** (61.93 ± 8.29) , **lesão + 3J** (61.87 ± 6.41) com $###p<0.001$.

Figura 60 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J, $###p<0.001$ vs. LESÃO).

A figura 61 demonstra uma redução da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima em protocolo de 12 horas quando comparado o grupo **lesão** (11.23 ± 2.99) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (99.45 ± 0.546) com $***p<0.001$. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + dexametasona** (50.28 ± 10.03), **lesão + diclofenaco** (55.68 ± 2.91) com $^{\#}p<0.05$ e quando comparado o grupo **lesão** (11.23 ± 2.99) e quando comparamos os grupo **lesão + 3J** (80.00 ± 12.36) ao grupo **lesão** (11.23 ± 2.99) com $^{xx*}p<0.001$ e aos grupos **lesão + dexametasona** (50.28 ± 10.03), **lesão + diclofenaco** (55.68 ± 2.91) com $^*p<0.05$.

Figura 61 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $***p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J, $^{\#}p<0.01$, $^{xxx}p<0.001$ e $^*p<0.05$ vs. LESÃO).

A figura 62 demonstra uma redução da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima em protocolo de 24 horas, quando comparado o grupo **lesão** (52.81 ± 6.20) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (99.71 ± 7.77) com $**p<0.01$ respectivamente. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo da: Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (97.01 ± 10.18), **lesão + 3J** (93.94 ± 9.67) com $###p<0.001$ ao grupo **lesão** (52.81 ± 6.20) e ao grupo **lesão + dexametasona** (66.72 ± 1.62) com $*p<0.05$.

Figura 62 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p<0.001$ vs. CONT E CONT +3J, $###p<0.01$ e $*p<0.05$ vs. LESÃO).

A figura 63 demonstra uma redução da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima em protocolo de 48 horas, quando comparado o grupo **lesão** (94.46 ± 3.16) quando comparado ao grupo **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (110.94 ± 7.80) com $**p<0.01$. Nos demais grupos tratados não foi observado diferenças significativas em relação ao grupo **lesão** (94.46 ± 3.16) .

Figura 63 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $**p<0,01$ vs. CONT e CONT+3J).

A figura 64 demonstra uma redução da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima em protocolo de 72 horas quando comparado o grupo **lesão** (67.58 ± 6.45) ao grupos **controle** (100.00 ± 0.00) com $^{**}p<0.05$. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + 3J** (132.0 ± 4.14) versus os grupos **lesão** (67.58 ± 6.45) e **lesão + dexametasona** (74.05 ± 4.03) com $^{***}p<0.001$ e quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (55.68 ± 2.91) versus os grupos **lesão** (67.58 ± 6.45) e **lesão + dexametasona** (74.05 ± 4.03) com $^{**}p<0.01$.

Figura 64 : Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n = 6$. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{**}p<0.05$ vs. CONT, $^{***}p<0.001$ e $^{##}p<0.05$ vs. LESÃO, LESÃO + DEXAMETAZONA respectivamente).

A figura 65 demonstra uma redução da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima em protocolo de 96 horas quando comparado o grupo **lesão** (67.26 ± 3.71) aos grupos **controle** (100.00 ± 0.00) e **controle + 3J** (100.61 ± 8.48) com $^{**}p<0.01$. Em relação aos grupos tratados foi observado um aumento significativo da Área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que esta tensão decaísse 50 % da amplitude máxima quando comparado os grupos **lesão + diclofenaco** (96.26 ± 6.61) versus o grupo **lesão** (67.26 ± 3.71) com $^{##}p<0.01$ e quando comparamos os grupo **lesão + 3J** (120.82 ± 6.67) ao grupo **lesão** (67.26 ± 3.71) com $^{***}p<0.001$.

Figura 65 : Tempo gasto para que a tensão muscular decaísse 50 % de sua amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n = 6. (ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls, $^{**}p<0.01$ vs. CONT E CONT +3J e $^{##}p<0.01$ e $^{***}p<0.001$ vs. LESÃO).

Caracterização histológica da curva de tempo por Microscopia, pela coloração por HE do músculo tibial anterior de ratos Wistar.

Grupo Controle

Figura 66 : Fotomicrografia – Pode-se observar a organização das fibras musculares íntegras, com os núcleos agrupados na periferia da célula (seta amarela), acidofilia uniforme na região central das fibras (seta preta) e discreto endomísio entre as fibras (seta branca). 400X.

Grupo Lesão 6 horas

Figura 67 : Fotomicrografia – Pode-se observar a disposição irregular dos núcleos, sendo que alguns se encontram posicionados na região central da fibra (seta branca); acidofilia irregular no interior das fibras, indicando rompimento das miofibrilas (seta amarela) e o endomísio já apresenta sinais de congestão vascular (seta preta). 400X

Grupo Lesão 12 horas

Figura 68 : Fotomicrografia – Pode-se observar uma grande desorganização nas fibras musculares, as linhas de interrupção da acidofilia citoplasmática são bastante evidentes (seta branca) e posicionamento dos núcleos de maneira irregular (seta preta). 400X

Grupo Lesão 24 horas

Figura 69 : Fotomicrografia – Pode-se observar que os núcleos estão tendendo se posicionar na periferia das células (seta amarela), porém, a acidofilia citoplasmática mantém-se descontínua (seta branca). É possível identificar pequenos focos hemorrágicos (seta preta). 400X

Grupo Lesão 36 horas

Figura 70 : Fotomicrografia – Pode-se observar que a organização das fibras musculares já se aproxima da organização normal (seta preta). Não se observa a descontinuidade da acidofilia na região central das fibras, porém, alguns núcleos ainda estão deslocados para a região central (seta branca). 400X

Grupo Lesão 48 horas

Figura 71 : Fotomicrografia – Pode-se observar características de completa normalidade morfológica das fibras musculares (seta preta), com os núcleos na periferia (seta branco), acidofilia uniforme e discreto endomísio (seta amarela). 400X.

Análise histológica após lesão e tratamento com Diclofenaco e Terapia Laser de Baixa Potência.

Grupo Controle + 3J -12 horas

Figura 72 : Fotomicrografia – Pode-se observar a organização das fibras musculares ílesas, com os núcleos agrupados na periferia da célula (seta branca), acidofilia uniforme na região central das fibras (seta amarela) e discreto endomísio entre as fibras (seta preta). 100X.

Grupo Lesão + Diclofenaco - 12 horas

Figura 73 : Fotomicrografia – Pode-se observar que parte dos núcleos celulares encontram-se deslocados para a região central da célula (seta preto), o endomísio apresenta sinais de congestão vascular (seta branca) e as áreas de perda da acidofilia se apresenta na forma de ilhas em algumas fibras e ocupam grandes extensão em outras (seta amarela). 100X.

Grupo Lesão + 1J - 12 horas

Figura 74 : Fotomicrografia - Pode-se observar a disposição irregular dos núcleos (seta preta), sendo que alguns se encontram posicionados na região central da fibra; acidofilia irregular no interior das fibras, indicando rompimento das miofibrilas (seta branca) e o endomísio apresenta sinais de congestão vascular (seta amarela). 100X.

Grupo Lesão + 3J - 12 horas

Figura 75 : Fotomicrografia - Pode-se observar que a organização das fibras musculares próxima da organização normal (seta amarela). Não se observa a descontinuidade da acidofilia na região central das fibras, porém, algumas fibras apresentam perda da acidofilia (seta branca). Alguns poucos núcleos ainda estão deslocados para a região central (seta preta). 100X.

Grupo Lesão + 6J - 12 horas

Figura 76 : Fotomicrografia - Pode-se observar a disposição irregular dos núcleos, sendo que alguns se encontram posicionados na região central da fibra (seta amarela); acidofilia irregular no interior das fibras, indicando rompimento das miofibrilas (seta branca) e o endomísio apresenta sinais de congestão vascular (seta preta). 100X.

Grupo Lesão + 9J - 12 horas

Figura 77 : Fotomicrografia – Pode-se observar algumas características bastante peculiares neste grupo. Parte dos núcleos celulares encontram-se deslocados para a região central da célula (seta amarela), o endomísio apresenta sinais de congestão vascular (seta branca) e as áreas de perda da acidofilia se apresenta na forma de ilhas nas diferentes fibras (seta preta). 100X.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos os efeitos da terapia com laser de baixa potência operando na região espectral do infra-vermelho sobre a lesão do músculo esquelético, utilizando para isto, o modelo de lesão muscular por estiramento controlado em músculo tibial de ratos.

O músculo, entre os tecidos biológicos, é o que apresenta maior plasticidade biológica, ou seja, com a maior capacidade de remodelamento frente a estímulos como atividade física, eletroestimulação, imobilização e condições hormonais (SILVKZ *et al.*, 2008). Além disso, é também o mais afetado por traumas decorrentes da prática esportiva e atividades da vida diária.

As lesões musculares, muitas vezes levam longo tempo de imobilização e uso de antiinflamatórios, podendo provocar o aumento nos números de fibras colágenas bem como a diminuição da quantidade de fibras musculares, contribuindo para alterações nas propriedades biomecânicas do músculo (JARVINEN *et al.*, 2002).

A Terapia Laser de Baixa Potência representa uma alternativa para o tratamento de lesões músculo-esqueléticas, podendo apresentar efeitos inibitórios ou estimulatórios, dependendo dos parâmetros utilizados na terapia. Neste sentido, é comum a utilização do termo biomodulador para citar seus efeitos sobre tecidos biológicos. Os objetivos clínicos da utilização da Terapia Laser de Baixa Potência em situações de lesão muscular visam a redução de efeitos adversos do uso de drogas anti-inflamatórias, a diminuição do tempo de imobilização, e ainda, a inibição ou até mesmo a resolução do processo inflamatório e a reparação do tecido muscular, restabelecendo as características funcionais do tecido.

O processo inflamatório possui alguns sinais característicos como calor, rubor, tumor, dor e perda da função como citado anteriormente. Algumas destas alterações podem ser bastante exacerbadas, dependendo do estímulo lesivo.

Quando há algum tipo de injúria tissular aguda, ocorrem normalmente alterações no fluxo vascular, no calibre e também na permeabilidade dos vasos sanguíneos da região afetada (YASUDA *et al.*, 2007). Nestas condições, pode

ocorrer o extravasamento de proteínas circulantes para o espaço intersticial, cerca de 7 vezes maior do que ocorre em um vaso normal (MOITRA *et al.*, 2007).

A lesão muscular induzida neste estudo teve por objetivo, induzir um processo inflamatório agudo com características semelhantes aquelas observadas em humanos. Neste estudo, foi utilizado o método de extravasamento de Azul de Evans, para que pudéssemos avaliar os efeitos da Terapia Laser de Baixa Potência sobre as alterações de permeabilidade vascular decorrentes da lesão.

Estas alterações de permeabilidade vascular normalmente ocorrem devido a liberação inicial de substâncias como histamina, serotonina e bradicinina que, além de causar dilatação arteriolar, tem como ação principal a indução de aumento da permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de macromoléculas protéicas do plasma para o interstício. A atividade edematogênica desses mediadores pode ser potencializada pela ação concomitante de prostaglandinas vasodilatadoras (RAKOS *et al.*, 2007). A albumina e sua quantidade que extravasa para os tecidos não é significativa em condições fisiológicas normais, no entanto, o extravasamento é importante na vigência de processo inflamatório (YASUDA *et al.*, 2007). No modelo utilizado, o corante azul de Evans, combinado com a albumina, sofre deslocamento do espaço intravascular em direção ao extravascular e deposita-se no interstício do tecido, como foi observado. Em nosso trabalho, observamos um extravasamento protéico, cujo pico máximo no músculo lesionado se deu no período de 6 horas, conforme podemos observar na curva temporal.

Partindo destes resultados os diferentes grupos foram tratados com a Terapia Laser de Baixa Potência nas energias de 1J, 3J, 6J e 9J, em paralelo um grupo foi tratado com Diclofenaco na dose de 1 mg/kg I.M (miligrama por kilograma intra-muscular), e os resultados foram avaliados 6 horas após a indução da lesão.

Ao sofrer a lesão, o músculo tibial reage aumentando sua permeabilidade vascular e liberando várias substâncias pró-inflamatórias. As principais citocinas que parecem estar envolvidas nestas condições são a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8). Além

destas, as prostaglandinas (principalmente a prostaglandina E2 (PGE2), estão relacionados diretamente na manutenção da inflamação e, conseqüentemente, da injúria tecidual (SKARE, 2007).

As prostaglandinas têm sido implicadas no aumento da permeabilidade vascular afetando o endotélio vascular durante o processo inflamatório. No entanto, muitas citocinas, como o (TNF- α), podem estimular a secreção de prostaglandinas pelas próprias células endoteliais (CHEN *et al.*, 1995).

Segundo Ivandic (2008), a radiação laser com comprimento de onda de 810 nm é eficaz no aumento do fluxo microcirculatório arterial e capilar, podendo atuar em processos álgicos agudos ou crônicos e inflamações agudas ou crônicas. Outro estudo realizado por Yousefi-Nooraie (2007) e Schindl *et al.* (2000), relatam a ação do laser de baixa potência na reabsorção de exsudatos, na eliminação de substâncias álgicas, redução na síntese de prostaglandinas, na alteração no metabolismo das serotoninas, na estimulação da microcirculação, restaurando a permeabilidade normal de vênulas e arteríolas.

Os resultados do extravasamento protéico do presente estudo corroboram com os trabalhos citados acima uma vez que desta forma foi observado uma redução desse extravasamento a níveis basais nos grupos tratados com Terapia Laser de Baixa Potência nas energias de 1 J, 3 J, 6 J e no grupo 9 J, 6 horas após a lesão. Estes resultados evidenciam uma atividade antiedematogênica, possivelmente interferindo na síntese de prostaglandinas determinando a redução nas alterações proporcionadas pela inflamação e ainda, auxiliando na reabsorção do exsudato.

Considerando o papel das citocinas pró-inflamatórias na liberação das prostaglandinas, entre elas o TNF- α , é possível que o efeito antiedematogênico que foi observado pela aplicação da Terapia Laser de Baixa Potência decorra, pelo menos em parte, da sua capacidade de reduzir os níveis de TNF- α , o que foi observado no presente estudo através da expressão gênica e protéica dessa citocina. Após a Terapia Laser de Baixa Potência ocorreu uma redução desses níveis tanto no grupo tratado com Diclofenaco, como nos grupos que receberam as energias de 1 J, 3J, 6J e 9J. O efeito de inibição da produção de TNF- α foi

descrito previamente em trabalhos do nosso grupo, em diferentes modelos experimentais (AIMBIRE *et al.*, 2006 a,b,c;).

O Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma proteína solúvel pertencente a uma categoria de moléculas denominadas monocinas secretadas por macrófagos e ativados por vários tipos de estímulos, inclusive por produtos bacterianos, acometendo vários processos patológicos (GWOZDZIEWICZOVÁ *et al.*, 2005). Dentre suas ações pró-inflamatórias, o TNF- α exerce várias atividade biológicas que inclui a proliferação, a diferenciação e a morte celular (apoptose) (PAUSOVA *et al.*, 2000; BOUCHER, 2005) estimula a produção de collagenases, aumenta a expressão de moléculas de adesão necessária para extravasamento leucocitário, inflamação etc.

Albertini (2008) e colaboradores demonstraram a redução (de 30 - 40%) no conteúdo de RNAm das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 3h após a irradiação com laser em músculo subplantar coletado de rato tratado com carragenina. Estes resultados demonstraram que a Terapia Laser de Baixa Potência apresenta uma ação antiinflamatória que possivelmente modula fatores de transcrição ligados à expressão de RNAm de COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias. Aimbire (2006) e colaboradores administraram Terapia Laser de Baixa Potência em modelos de pleurite induzidas por Bovine Serum Albumin (BSA) mostraram a redução da expressão dos níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar após a irradiação.

Nossos resultados corroboram com a literatura quando observamos os níveis elevados das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 na lesão induzida pelo alongamento passivo, onde, após o aumento do TNF- α ocorreu uma elevação exarcebada nos níveis da IL-1 β indicando a lesão muscular. Com o aumento da IL-6, podemos inferir que houve uma liberação de maneira seqüencial de IL-10 com o objetivo de controlar a reação inflamatória.

Em nosso estudo observamos que a Terapia Laser de Baixa Potência conseguiu inibir a produção gênica e protéica de TNF- α , chegando ao nível basal. Sabe-se que o TNF- α influencia a permeabilidade vascular, proporcionando o extravasamento de marcadores de injúria muscular como, por exemplo, a enzima creatina kinase (CK). Através dos dados obtidos neste trabalho em relação ao

TNF- α podemos inferir que, uma vez que o alongamento produz estresse mecânico, o qual é capaz de provocar microlesões no tecido alongado e/ou induzir a liberação de mediadores químicos, contribuindo para um aumento no extravasamento da CK, a Terapia Laser de Baixa Potência além de reduzir os níveis de TNF- α , está atuando na inibição desse marcador de lesão muscular (CK) e alterando a permeabilidade vascular.

Em relação a IL1- β foi observado que a Terapia Laser de Baixa Potência conseguiu inibir a produção dessa citocina. Este fato assume relevância para o curso da lesão, pois sugere uma diminuição de dor e desconforto muscular, uma vez que essa citocina está relacionada diretamente com o grau de lesão e desta forma, podemos dizer que os grupos tratados com a Terapia Laser de Baixa Potência reduziu o quadro da lesão em todas as energia utilizadas.

A IL-6 é uma molécula de sinalização intercelular associada com o controle e a coordenação de respostas imunes, sendo secretada pelos macrófagos e linfócitos em resposta a lesão ou infecção. O aumento da produção de IL-6 pode regular o processo de dor muscular causando desconforto e a inibição dessa citocina, como foi observado nos grupos tratados com a Terapia Laser de Baixa Potência, sugere uma inibição desse quadro doloroso.

Uma vez que a IL-6 é liberada, irá levar ao hepatócito a informação da necessidade de síntese de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) (ROGERO *et al.*, 2005; NIEMAN *et al.*, 2005; SMIT *et al.*, 2008). A determinação da concentração plasmática dessa proteína ajuda, clinicamente, a avaliar a presença, a extensão e a atividade do processo inflamatório e a monitorar a evolução e a resposta terapêutica.

A Proteína C Reativa (PCR) pode ser encontrada em diversas situações clínicas como, doenças reumáticas e cardiovasculares, infecções, neoplasias, Diabetes Mellitus, obesidade, doença periodontal, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), tabagismo e outras doenças relacionadas com inflamação sistêmica aguda e representa um aspecto muito importante com relação a sua interação com o sistema complemento, o qual é um dos mecanismos de defesa do organismo contra elementos estranhos (DANESH *et al.*, 2004; SIN, MAN, 2003).

A PCR representa um indicador extremamente sensível de inflamação aguda, corroborando com o presente estudo. Um aumento significativo foi observado no grupo lesionado no protocolo de 6 horas e 12 horas, caracterizando um quadro inflamatório agudo. Após o tratamento com Diclofenaco e com a Terapia Laser de Baixa Potência nas energias 1 J, 3 J, 6 J e 9 J, tanto no protocolo de 6 horas com no protocolo de 12 horas, foi observado uma redução significativa da inflamação com a inibição quase total dos níveis da PCR.

De acordo com Montenegro e Fecchio (1999), mediadores como a bradicinina, a histamina, além de outras substâncias químicas, é capaz de controlar ou desencadear a resposta inflamatória, tem como tarefa informar ao organismo que células foram lesadas e assim mobilizar meios para que o organismo possa lidar com a situação. As substâncias químicas modificam e regulam o restante da resposta inflamatória, tentando neutralizar a causa da lesão e começar a remover os detritos celulares, de modo que a reparação aconteça (MONTENEGRO E FECCHIO, 1999; TESTA *et al.*, 2007).

Os mediadores da inflamação podem ser produzidos pelas vias da ciclooxigenase e lipooxigenase, a partir do metabolismo do ácido araquidônico e outros ácidos graxos. São conhecidas duas isoformas de COX: a COX-1, expressa constitutivamente e capaz de produzir pequenas quantidades de prostaglandinas que visam à manutenção das funções fisiológicas, e a COX-2 que é produzida após um estímulo danoso pró-inflamatório (MATSUMOTO, 2008). A COX-2 também pode ser expressa constitutivamente em alguns tecidos como, por exemplo, no córtex cerebral e hipocampo. Por outro lado, a COX-2 parece apresentar possíveis efeitos fisiológicos e até mesmo um papel importante na resolução do processo inflamatório. O recente advento dos animais “knock out” para COX-2 constatou que em modelos simples como o edema de pata induzido por carragenina, a ausência do gene da COX-2 impede a resolução da inflamação (RAJAKARIAR *et al.*, 2006).

A COX converte o ácido araquidônico, liberado a partir das membranas plasmáticas celulares pela ação da fosfolipase A₂, em prostaglandina G₂

prostaglandina H_2 , originando Prostaglandina E_2 e tromboxano (MATSUMOTO, 2008).

Em nosso estudo foi realizada uma curva temporal da expressão gênica de COX-1 e COX-2 no músculo lesionado. Para COX-1 o pico máximo da expressão ocorreu em 12 horas e para COX-2 o pico máximo da expressão em 6 horas. A determinação da expressão gênica de COX-1 e COX-2 foi realizada por PCR em Tempo Real e observamos aumento na expressão gênica de COX-1 no grupo tratado com Terapia Laser de Baixa Potência na energia de 1 J, enquanto os grupos tratados com as energias de 3 J e 6 J retornaram aos valores basais. Em relação à expressão gênica de COX-2, foi observado em todos os grupos tratados com a Terapia Laser de Baixa Potência uma tendência ao aumento da expressão, mas com significância no grupo que recebeu a energia de 1J. Em outras palavras, no modelo experimental é observado redução de mediadores inflamatórios clássicos, porém com aumento da expressão gênica de uma das isoformas da enzima ciclooxigenase a COX 2.

Partindo dos resultados da expressão gênica foi realizada uma curva temporal da expressão protéica de COX-1 e COX-2 no músculo lesionado. O pico máximo da expressão protéica para COX-1 e COX-2 ocorreu em 12 horas através da técnica de Western Blotting, observado através a alteração na intensidade das bandas.

Quando analisamos os resultados obtidos nos grupos tratados no período de 12 horas observamos uma redução da intensidade das bandas de COX-1 e COX-2 nos grupos diclofenaco e nos grupos irradiados com as energias de 1J, 3J e 6J. Estes resultados mostraram uma redução da expressão protéica após a Terapia Laser de Baixa Potência, sugerindo uma possível ação anti-inflamatória do Laser pela redução na formação dessas enzimas.

Quando analisamos os resultados obtidos no grupo tratado com 9J, observamos um aumento na intensidade das bandas da COX-1 e principalmente da COX-2

Este fato parece paradoxal a primeira vista, mas segundo Serhan (2005), a aspirina em baixas doses é capaz de acetilar a enzima ciclooxigenase,

possibilitando a formação de precursores de substâncias anti-inflamatórias endógenas denominadas resolvinas (RAJAKARIAR, 2006). Estas enzimas são chave no processo inflamatório, passariam então a agir sobre ácidos graxos poli-insaturados como o ômega 3, levando a formação de resolvinas. Desta maneira podemos encontrar enzima ciclooxigenase ativa, porém, agindo sobre outro substrato, diferente do ácido araquidônico e levando a formação de resolvinas. Neste sentido, os resultados obtidos com o tratamento de 9J na expressão protéica para COX-2 apontam para um efeito semelhante aquele observado para aspirina, onde a radiação laser pode estar provocando algum tipo de alteração bioquímica na via enzimática das enzimas ciclooxigenases, que não está resultando na produção de prostaglandina E₂, mas possivelmente, de algum outro mediador bioquímico uma vez que a energia de 9J reduziu os marcadores bioquímicos da inflamação e melhorou a capacidade funcional do grupo. No entanto, o resultado final desta alteração parece ser a redução dos sinais de inflamação.

Como demonstrado nos nossos resultados do processo inflamatório, podemos observar uma redução do extravasamento plasmático, dos níveis de TNF- α , IL 1, IL 6, IL 10, da PCR e ainda da avaliação funcional com o tratamento da Terapia Laser de Baixa Potência, porém estudos complementares e análise de outros mediadores do processo inflamatório como, lipoxina e a PGE2 se tornam necessários para confirmar essa hipótese.

O presente estudo avaliou também a função motora, através da análise de marcha nos grupos estudados através das médias do Índice Funcional do Ciático. Foi caracterizada uma curva de tempo da lesão em relação à função motora, pela qual optamos pelo período de 12 horas, período esse em que o grupo demonstrou uma maior dificuldade em caminhar.

A análise após o protocolo de 12 horas de indução da lesão demonstrou que no grupo lesão ocorreu perda da função motora, o que fez com que houvesse alteração no padrão de marcha dos animais. A marcha do grupo lesionado apresentou-se nitidamente afetada, retratada, principalmente pela transferência de peso para lado hígido do animal.

O laser de baixa potência ativa os componentes da cadeia respiratória mitocondrial, resultando na iniciação de uma cascata de eventos celulares (KARU, 2003). O principal efeito bioelétrico da fotobiomodulação laser é a manutenção do potencial de membrana celular, o que impede que os estímulos dolorosos se propaguem a centros nervosos, isso devido à eficiência da bomba de sódio e potássio ocasionada pela maior disponibilidade de ATP resultante do efeito bioquímico (RICCI, 2003). O efeito analgésico do laser de baixa potência se deve à sua ação em diversos níveis. Localmente, ocorre redução da inflamação por meio da reabsorção de exsudatos e da eliminação de substâncias angiogênicas como foi descrito anteriormente. Há também interferência na mensagem elétrica durante a transmissão do estímulo, mantendo o gradiente iônico em ambos os lados da membrana celular e evitando ou reduzindo a despolarização da mesma. Além de atuar sobre as fibras nervosas grossas que, quando estimuladas pelo laser, provocam bloqueio das fibras finas (CHAVANTES, 1990). Quando analisado o grupo tratado com diclofenaco e os grupos tratados com a Terapia Laser de Baixa Potência nas energias de 1J, 3 J e 6 J foi observado uma melhora significativa na função motora. Essa melhora pode ser constatada pelas características de deambulação, ou seja, a transferência de peso proporcional entre os dois lados, sugerindo que as alterações na permeabilidade da membrana celular possa ter impedido os estímulos dolorosos devido à eficiência do efeito bioquímico e analgésico do laser de baixa potência melhorando assim a deambulação dos grupos tratados.

Outros mecanismos relatados de efeitos benéficos induzidos pela radiação laser, já citados anteriormente, incluem a modulação dos níveis de prostaglandinas, o aumento da atividade fibroblástica, a alteração do potencial evocado somatosensorial e da velocidade de condução nervosa, além de melhora da circulação local dos tecidos tratados, levando ao alívio da dor e reparo tecidual (GUR, 2004; FIKACKOVA, 2006).

Em outro grupo de experimentos, visamos avaliar outros parâmetros funcionais como força muscular e resistência à fadiga muscular, utilizando para isto um protocolo já anteriormente descrito pelo grupo (LOPES-MARTINS *et al.*,

2006), de fadiga muscular induzida por estimulação elétrica em músculo tibial de ratos. Neste artigo foram demonstrados os efeitos da Terapia Laser de Baixa Potência aumentando a resistência muscular, assim como reduzindo os níveis de Creatina Kinase no modelo. No presente estudo também avaliamos a diminuição da fadiga muscular em músculo tibial de ratos após contração tetânica por estímulos elétricos indiretos após lesão muscular por estiramento, em grupos tratados com diclofenaco e com a Terapia Laser de Baixa Potência nas energias de 1 J, 3 J, 6 J e 9 J.

A presença da lesão muscular provoca uma diminuição no desempenho e uma redução da capacidade de gerar força.

Um dos mecanismos que desencadeia a lesão muscular é o influxo excessivo de cálcio do interstício para o interior da fibra muscular, resultando em níveis elevados de cálcio intracelular, que por sua vez é gerado pelos danos ocorridos no sarcoplasma ou no retículo sarcoplasmático da fibra, esse processo leva à perda da homeostase e estímulo para a proteólise cálcio-dependente, provocando assim, uma degeneração tecidual (KARU, 2003; WILDEN, 1998).

No meio intracelular, o excesso de cálcio faz com que a mitocôndria acumule esse íon o qual inibe a respiração celular e a produção de energia, comprometendo a capacidade da célula de ativamente eliminar o cálcio de seu interior. A sobrecarga de cálcio, então, precipita uma fase autogênica onde um aumento na ação de proteases e fosfolipases resulta na degradação das miofibrilas e da membrana celular, ocorrendo um comprometimento na síntese de glicogênio quando o músculo está lesionado (KARU, 1999; SHERHAN, 2005), possivelmente o que tenha ocorrido com o grupo lesionado do presente estudo, uma vez que foi observada uma redução na capacidade de gerar força de contração e uma redução na resistência a fadiga, o que nos leva a pensar na dificuldade da geração de energia dificultando a eliminação de cálcio prejudicando assim a respiração celular.

A luz laser pode ser absorvida no ciclo respiratório (KLIMA, 1989; KARU, 1999), por componentes fotorreceptores aumentando a produção de ATP mitocondrial. Considerando que a absorção de luz fornece energia para a célula e

que essa energia é absorvida pelo citocromo C, na mitocôndria, a célula pode utilizar essa energia no ciclo respiratório para produzir ATP. Estes dados em conjunto, estão de acordo com a nossa proposta de fornecer à célula a quantidade ideal de energia que irá atuar num determinado espectro para produção de energia pela célula. Vieira *et al.* (2006) sugere que a eficácia do efeito biomodulador que é atribuído a luz laser ao interagir com os tecidos biológicos é dependente das condições metabólicas prévias do tecido, ou seja, a resposta tende a ser ótima quando o potencial redox celular se encontra alterado, por exemplo, em um quadro de lesão tecidual no qual o ambiente celular apresenta uma diminuição do pH e do suprimento energético, o que favorece uma maior interação da radiação com os tecidos, e assim, uma maior resposta biológica final.

Neste modelo experimental, observamos que os animais tratados com a Terapia Laser de Baixa Potência e com o diclofenaco obtiveram um aumento na intensidade da força de contração na primeira tetania. Quando comparamos as três tetanias, observamos que a melhor dose de energia foi a de 9J, equiparando na segunda e na terceira tetania ao grupo tratado com diclofenaco. Devido vasodilatação pela irradiação laser, pode ter ocorrido uma diminuição do pH sanguíneo, fenômeno esse chamado de vasodilatação ácido-metabólica, o qual é sugerido como um fator que contribuiu para a regulação local do fluxo sanguíneo durante a hipóxia e aumento da atividade metabólica. Provavelmente isso tenha contribuído com os grupos tratados com a Terapia Laser de Baixa Potência, pois os mesmos apresentaram tensão máxima de contração maior ao grupo lesionado. De acordo com a teoria da regulação do fluxo sanguíneo, metabólitos vasoativos são liberados da fibra muscular na proporção das atividades e difusão e essa vasodilatação metabólica aumenta o suprimento de oxigênio e nutrientes em resposta à demanda tecidual (JACOBS; SEGAL, 2000; SANTOS *et al.*, 2002).

Os animais irradiados aumentaram a resistência à fadiga na primeira tetania até mesmo em relação ao grupo tratado com diclofenaco. Quando comparado as três tetanias a melhor dose de energia foi de 9J, demonstrando um aumento na resistência a fadiga superior dos grupos tratados com a Terapia Laser

de Baixa Potência em relação ao grupo tratado com diclofenaco. Podemos inferir que uma vasodilatação provocada pela irradiação laser poderia estar atuando nas células musculares, aumentando o tempo para que o músculo em tetania tivesse uma queda no seu valor máximo de intensidade de contração pela metade (50 %).

Ao analisar a área sobre a curva da fadiga registrada no eletrofisiógrafo, foi possível observar um aumento da resistência a fadiga nos animais irradiados na primeira tetania. Comparado as três tetanias, foi observado que a melhor dose de energia foi a de 1J e 9J que se sobrepôs ao grupo tratado com diclofenaco na primeira e na terceira tetania.

Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que a pré-irradiação de atletas com Laser de Baixa Potência, tanto no comprimento de onda na faixa do vermelho assim como no infravermelho, foram capazes de aumentar a resistência à fadiga muscular, e de acelerar a queda das concentrações de ácido láctico plasmático e Creatina Kinase (LEAL JR 2008 a e b no prelo; LOPES-MARTINS, 2006;).

GOLD *et al.*, 1996, relataram em seus estudos que o fotorelaxamento não é atenuado pela inibição de NO-GMP_c, contudo experimentos *in vivo* em laboratórios demonstraram indução significativa de iNOS, após irradiação laser em artéria ilíaca de coelhos (MOITRA, 2007).

Kipshidze *et al.*, 2000, demonstraram em seus estudos que a luz ultravioleta visível produz relaxamento vascular com a elevação do GMP_c. Especula-se que a absorção da luz pelo tecido vascular, através da indução do NO, eleva o GMP_c. A vasodilatação estaria sendo provocada pelo efeito hipotensor tanto pelos inibidores da fosfodiesterase como pelos nitrovasodilatadores do GMP_c circulante.

De acordo com nossos resultados, se a irradiação laser eleva os níveis de GMP_c, possivelmente estaria ocorrendo uma importante vasodilatação local, facilitando assim, o transporte de nutrientes para região irradiada como também a remoção de metabólicos que prejudicasse a contração muscular.

Os traumas musculares podem acarretar lesões de grande magnitude, os macrotraumas, ou lesões de pequena magnitude, os microtraumas, com resposta inflamatória da magnitude e do grau de vascularização do músculo atingido.

Nos dizeres de Jävinen (1975); Minamoto *et al.* (1999) e Sato *et al.* (2003); independentemente do tipo e do mecanismo da lesão, existem alterações morfológicas e metabólicas que devem ser consideradas. Independente do tipo da lesão (mecânica, térmica, isquêmica ou por substâncias tóxicas) a cicatrização muscular segue uma série de eventos já estabelecidos, sendo esta sequência a necrose das células satélites lesadas, infiltração inflamatória, fagocitose das células lesadas, ativação das células satélites e por último a diferenciação das células precursoras (MERRICK, 2002).

Como consequência do rompimento de fibras musculares há uma ruptura da membrana celular, o sarcolema, causando assim uma extrusão das organelas para o meio extracelular, ainda podendo ser observado a presença de infiltrado inflamatório, prejudicando o fluxo sanguíneo nas áreas adjacentes a lesão, levando à diminuição de oxigênio.

O músculo esquelético tem uma considerável capacidade de regeneração da fibra muscular sendo limitada pela população de células satélites, revascularização e reinervação, este processo é lento e geralmente incompleto, com grande formação de tecido cicatricial, este de consistência fibrosa e pouco elástica, podendo alterar a força e extensibilidade muscular.

Tanto a extensão da lesão como o tratamento são importantes, pois a regeneração muscular é um processo complexo, provocando alterações morfológicas das fibras regeneradas, podendo afetar o desempenho muscular pós lesão (MINAMOTO *et al.*, 1999).

No presente estudo podemos observar através da caracterização histológica que o grupo lesão 12 horas foi o que sofreu o maior dano em suas estruturas. Partindo desses resultados foi realizado o protocolo de estiramento muscular nos grupos no período de 12 horas e tratados com a Terapia Laser de Baixa Potência e com Diclofenaco.

Logo após a lesão muscular, há uma resposta inflamatória que dura de três a cinco dias, e neste estágio, o laser aumenta a atividade dos macrófagos (FISHER, 2000). De acordo com Amaral *et al.*, a radiação direta do Laser, utilizado nos primeiros dias após a excisão parcial do músculo gastrocnêmio de

rato, promoveu o processo regenerativo e a maturação muscular da região lesionada. Em sua pesquisa utilizou diferentes doses, demonstrando que apenas a dose de 2,6J do laser He-Ne promoveu mudanças significativas, como o aumento da área da fibra muscular e aumento da densidade mitocondrial, sugerindo assim, que doses baixas de irradiação de laser seriam mais efetivas na promoção dos efeitos bioestimulatórios. Segundo Medrado *et al.*, (2003) ao comparar as doses de 4 e 8J utilizando um laser de diodo de 670 nm, constataram que o grupo que recebeu 4J de tratamento exibiu mais células em correlação com maior proliferação vascular e apresentou maior redução do diâmetro das úlceras tratadas.

No espectro eletromagnético, comprimentos de onda entre 600 e 1300 nm são mal absorvidos e dispersos na epiderme e derme, assim, penetram mais profundamente (SCHINDL *et al.*, 2000). Bliddal *et al.*, (1987) utilizaram um laser de diodo de 860 nm para irradiar fibroblastos humanos com energia de 2J e observaram um aumento tanto na proliferação celular quanto na atividade enzimática, enquanto que a energia de 12J inibiu estes processos. O modelo de lesão muscular utilizado neste estudo foi escolhido por ser o tipo de lesão muscular que se assemelha com as lesões que acontecem principalmente o meio esportivo. Nos dizeres de Martin (2003), células e tecidos comprometidos respondem melhor em relação às células e tecidos saudáveis à irradiação do Laser de Baixa Potência, pela transferência de energia que ocorre entre os fótons emitidos pelo Laser de Baixa Potência e os cromóforos receptivos que são encontrados em várias células e organelas subcelulares. Tecidos e células que estão isquêmicos e pouco perfundidos como resultado de um processo inflamatório, edema e lesão têm mostrado ter uma resposta significativamente aumentada após a irradiação do Laser de Baixa Potência em relação as estruturas normais. Os resultados da avaliação histológica deste estudo demonstram que a ação do laser não evitou o surgimento dos sinais de lesão muscular observados, mais produziu uma redução das áreas e sinais de alterações teciduais, como células bem delineadas, menor quantidade de fibras

fragmentadas, observou-se uma redução na acidofilia na região central das fibras, principalmente no grupo tratado com o Laser de Baixa Potência na energia de 3J. Medrado *et al.* (2003), verificou que durante os primeiros dias os sinais da inflamação aguda foram menos intensos e cessaram mais cedo nos animais tratados e a redução da extensão do edema foi um importante efeito precoce da terapia com Laser. Tal fato fundamenta-se na capacidade do Laser em acelerar o processo de reparação tecidual. A luz Laser não exacerba o processo inflamatório, mais abrevia o tempo para a resolução por meio da aceleração do processo de reparação tecidual (MARTIN, 2003; MEDRADO *et al.*, 2003).

Pelo fato de que a irradiação Laser é fotoquímica, a energia é absorvida por cromóforos intracelulares e convertida em energia metabólica, aumentando assim, o metabolismo celular (BEN-DOV *et al.*, 1999; SHEFER *et al.*, 2001). Um grande número de proteínas reativas que respondem à estimulação do Laser são enzimas. A luz Laser amplia a estimulação de enzimas benéficas e deprime as deletérias. Enzimas citocromáticas como citocromo E oxigenase e óxido nítrico sintase são reativas à fotoestimulação do Laser, e desta forma, acelerando suas funções e aumentando a quantidade de ATP e óxido nítrico, os quais promovem um aumento no metabolismo celular e da função nervosa e melhora da circulação (MARTIN, 2003). A irradiação Laser produz um potencial eletroquímico extra e um aumento da síntese de ATP no interior da mitocôndria isolada quando comparada à mitocôndria controle que não recebeu irradiação (BECKERMAN *et al.*, 1992). Baixas doses de luz intensificam a formação de um gradiente de fóton eletroquímico transmembrana na mitocôndria, que é seguido por uma liberação de cálcio da mitocôndria no citoplasma, que subsequentemente estimula a mitose e a proliferação celular. Já altas doses de luz, aumentam em muito a liberação de cálcio, causando hiperatividade das bombas de cálcio ATPase e esgotam o pool de ATP da célula, assim inibindo o metabolismo celular (SCHINDL *et al.*, 2000).

Com aumento da energia e da oxigenação celular e a melhora da microcirculação e da síntese de proteínas sinalizadoras especializadas como os fatores de crescimento, mostram-se influenciados pelos fótons, razão pela qual a cicatrização é acelerada pela radiação Laser (FAROUK; BERNARD, 2001). O

efeito relativamente prolongado do Laser de Baixa Potência na proliferação de células associadas com fibras isoladas pode ser atribuído aos fatores secretados pelas fibras em resposta à radiação (SHEFER *et al.*, 2002).

Um possível esquema das mudanças na proliferação das células de mamíferos pela luz Laser é a transdução do fotosinal e amplificação da cadeia com as respectivas reações bioquímicas na célula, em seguida, a luz é absorvida na mitocôndria e a estimulação da síntese de DNA e RNA acontece como um passo final após a cascata de reações bioquímicas na célula. Irradiação com laser de He-Ne durante a regeneração do músculo esquelético promove o processo de neoformação vascular na zona lesionada (FISHER *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2001; BEN-DOV *et al.*, 1999; MARTIN, 2003; GONZÁLEZ, CRUAÑAS, 1988).

Foi observado neste estudo que as lâminas histológicas dos músculos irradiados com energia de 3J apresentaram maior quantidade de células com seus núcleos na periferia em relação aos demais grupos tratados. Segundo Falkener *et al.* (FAULKNER; BROOKS, 1993), a presença de núcleos localizados na periferia da célula é um indicativo de fibra muscular madura. Com o preenchimento da região de regeneração da fibra com proteínas contráteis, os núcleos musculares vão sendo empurrados para a periferia, adquirindo a aparência de uma fibra madura (FAULKNER; BROOKS, 1993). Pode-se concluir que os resultados da análise histológica demonstraram que as lâminas dos cortes histológicos dos músculos tibiais tratados com Laser de Baixa Potência de 810 nm na energia de 3J apresentaram uma melhora qualitativa, com uma melhor organização do tecido muscular.

7 CONCLUSÃO

A Terapia Laser de Baixa Potência (810nm) foi efetiva em reduzir o processo inflamatório e o dano muscular induzido por estiramento muscular em ratos, conduzindo a uma melhora significativa nos padrões funcionais.

Tomados em conjunto, nossos resultados evidenciam o efeito benéfico e terapêutico da Terapia Laser de Baixa Potência, no modelo experimental de lesão muscular induzida por estiramento em ratos.

A Terapia Laser de Baixa Potência foi capaz de preservar características funcionais evidenciadas nos testes de caminhada e de contração muscular.

Além disso, pode-se também considerar que a Terapia Laser de Baixa Potência possui algumas vantagens com relação à terapia farmacológica como, por exemplo, a ausência de efeitos adversos gastrintestinais e consequente redução dos custos com o tratamento destes efeitos. Ressalta-se ainda, que a recente retirada de circulação das drogas inibidoras da enzima COX-2 devido a efeitos adversos cardiovasculares graves deixa uma lacuna importante na terapia anti-inflamatória, que pode ser compensada possivelmente pela Terapia Laser de Baixa Potência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.; VILLAYERDE, A. B.; SILVA, J. A. JR COSTA, M. S. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. **Inflamm. Res.**, v.56, n.6, p.228-9, 2007.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.S.; CORREA, F.I.; RIBEIRO, W.; COGO, J.C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S.A.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; ZÂNGARO, R.A.; LOPES-MARTINS, R.A. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 27, n. 74, p.101-7, 2004.

ALBERTINI, R.; ISHIDA, F.C.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E, TEIXEIRA, S.; DE NUCCI, G.; FARAI-NETO, H. C. C.; AIMBIRE F. S.C.; ZÂNGARO, R. A.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Análise do efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. **Fisioterapia Brasil**, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p. 5 - 15, 2002.

AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R.A.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; MARTINS, P.S.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser therapy on hemorrhagic lesions induced by immune complex in rat lungs. **Photomed. Laser Surg.**, v. 25, n. 2, p.112-7, 2007.

AIMBIRE, F.; BJORDAL, J.M.; IVERSEN, V.V.; ALBERTINI, R.; FRIGO, L.; PACHECO, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; CHAVANTES, M.C.; LABAT, R.M.; LOPES-MARTINS, R.A. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, n. 8, p.773-8, 2006.

AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R.A.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; ALBERTINI, R.; CHAVANTES, M.C.; PACHECO, M.T.; LEONARDO, P.S.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M.; Low-level laser therapy can reduce lipopolysaccharide-induced contractile force dysfunction and TNF-alpha levels in rat diaphragm muscle. **Lasers Med. Sci.**, v. 21, n. 4, p.238-44, 2006.

AIMBIRE, F.; ALBERTINE, R.; DE MAGALHAES, R.G.; LOPES-MARTINS, R.A.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; ZANGARO, R.A.; CHAVANTES, M.C.; PACHECO,

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

M.T. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers Med. Sci.**, v. 20, n. 1, p.11-20, 2005.

AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M.T.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; LEONARDO, P.S.L.M.; IVERSEN, V.V.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; BJORDAL, J.M. Low level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF- α level in acute inflammation. **Photomed. Laser Surg.**, v.24, n.1, p.33-37, 2006.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBERE, F.; BJORDAL, J.M.; BRUGNERA, A.J.R.; MITTMANN, J.; SILVA J.R., J.A.; COSTA, M.S. Cytokines mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan induced inflammation after low level therapy (LLLT). **Photomed. Laser Surg.**, v.26, n.1, p.19-24, 2008.

ANDERSON, M.W.; IZUTSU, K.T.; RICE, J.C. Parotid gland pathophysiology after mixed gamma and neutron irradiation of cancer patients. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.52, n.5, p.495-500, 1981

ARAÚJO, C. G. S. **Avaliação e treinamento da flexibilidade**. São Paulo: Atheneu, 1999.

ARMOSTRONG, R. Initial events in exercise-induced muscular injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.22, p.429-135, 1990.

APPEL, J.; SOARES, J.; DUART, J. Exercise, muscle damage and fatigue, **Sports Med.**, v.13, p.108-115, 1992.

ALMEIDA-LOPES, L. *et al.* Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg. Med.**, v. 29, p. 179-184, 2001.

AL-NAEMI, H.; BALDWIN, A. L. Nitric oxide: role in venular permeability recovery after histamine challenge. **Am. J. Physiol.**, v. 46, H2010-H2016, 1999.

AMARAL, A.C.; PARIZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Laser Med. Sci.**, v.16, p. 44-51, 2001.

BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy – still not na established clinical tool. **Lasers Surg. Med.**, v.16, n.4, p. 331-42, 1995.

BASFORD, J.R. Laser therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopaedics**, v.16, n.5, p.541-7, 1993.

BASFORD, J.R. Low-intensity laser therap: controversies and new research findings. **Lasers Surg. Med.**, v.9, p. 1-5, 1989.

BASFORD, J.R. Low-energy laser treatment of pain and wounds, hype, hope or hokum. **Proc. Mayo Clin.**, v.61, p.671-77, 1986.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers**: theory and practice. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.

BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1448, p. 372-380, 1999.

BECKERMAN, H.; BOUTERK, D.E.; CRYPER, H. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria-based metanalysis of randomized clinical trials. **Phys. Ther.**, v.72, p. 483-491, 1992.

BISLAND, S. K.; GOEBEL, E. A.; HASSANALI, N. S.; JOHNSON, C.; WILSON, B. C. Increased expression of mitochondrial benzodiazepine receptors following low-level light treatment facilitates enhanced protoporphyrin IX production in glioma-derived cells in vitro. **Lasers Surg Med.**, v.39, n.8, p.678-84, 2007.

BJORDAL, J.M.; KLOVNING, A.; LOPES-MARTINS, R.A.; ROLAND, P.D.; JOENSEN, J.; SLØRDAL, L. Overviews and systematic reviews on low back pain. **Ann. Intern. Med.**, v.148, n.10, p. 789-90, 2008.

BJORDAL, J.M.; LOPES-MARTINS, R.A.; JOENSEN, J.; COUPPE, C.; LJUNGGREN, A.E.; STERGIOULAS, A.; JOHNSON, M.I. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 29, n.9, p. 75, 2008.

BJORDAL, J.M.; JOHNSON, M.I.; LOPES-MARTINS, R.A.; BOGEN, B.; CHOW, R.; LJUNGGREN, A.,E. Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. **BMC Musculoskelet. Disord.**, v. 22, n. 8, p.51, 2007.

BJORDAL, J.M.; LOPES-MARTINS, R.A.; IVERSEN, V.V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with

microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. **Br. J. Sports Med.**, v.40, n.1, p.76-80, 2006.

BLIDDAL, H; HELLESEN, C.; DITLEVSEN, P.; ASSELBERGHS, J.; LYAGER, L. Soft-laser therapy of rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, v.16, n.4, p. 225-8, 1987.

BOUCHER, J. Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. **Hum. Metab. Res.**, v. 37, n. 12, p. 761-767, 2005.

BOULNOIS, J.L. Photophysical processes in recent medical laser development: a review. **Lasers Med. Sci.**, v.1, p. 47-66, 1985.

BROSSEAU, L.; WELCH, V.; TUGWELL, P.; BIE, R.; GAM, A., HARMAN, K.; SHEA, B.; MORIN, M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Metaanalysis J. Rheumatol.**, v. 27, n.8, p.1961-1969, 2000.

BRUGNERA, A.; PINHEIRO, A. L. **Laser na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

BUFORD, T.W.; COOKE, M.B.; SHELMADINE, B.D.; HUDSON, G.M.; REDD, L.; WILLOUGHBY, D.S. Effects of eccentric treadmill exercise on inflammatory gene expression in human skeletal muscle. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v. 34, n. 4, p. 745-53, 2009.

BUFORD, T.W.; COOKE, M.B.; REDD, L.L.; HUDSON, G.M.; SHELMADINE, B.D.; WILLOUGHBY, D.S. Protease Supplementation Improves Muscle Function after Eccentric Exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 2009. In press.

CAMPANA, V. R.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; SORIANO, F.; JURI, H. O.; SPITALE, L. S.; SIMES, J. C., PALMA, J. A. The relative effects of He-Ne laser and meloxicam on experimentally induced inflammation. **Laser Ther.**, v.11, n.2, p.6-10, 2000.

CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTO, A.; JURI, H.; PALMA, J.A. Effects of diclofenac sodium and HeNe laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.16, n.6, p.317-20, 1999.

CARDOSO, E. A. **Alterações estruturais do músculo esquelético submetido a alongamento passivo em ratos**. Dissertação - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

CARPENTER, S.; KARPATI, G. **Pathology. Of skeletal muscle**. New York: Churchill Livingstone, 1984.

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 209-238, 2004.

CHAVANTES, M.C.; JANETE, A.D. Aplicação de laser na área cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 54, n. 1, p. 63-8, 1990.

CHEN, D. B.; YANG, Z. M.; HILSENTHATH, R.; LÊ, S. P.; HARPER, M. J. Stimulation of prostaglandin (PG) F₂ alpha and PGE₂ release tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha in culture human luteal phase endometrial cells. **Hum. Reprod.**, v. 10, p. 2773-2780, 2001.

CLARKSON, P.; BYNES, W.; McCORMICK, K.; TURCOTTER, L.; WHITE, J. Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric and concentric exercise. **Int. J. Sports Med.**, v.7, p.152-155, 1986.

CLARKSON, P.; NOSAKA, K.; BRAUN, B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.24, p.512-520, 1992.

CORREA, F.; MARTINS, R. A.; CORREA, J. C.; IVERSEN, V. V.; JOENSON, J.; BJORDAL, J. M. Low-level laser therapy (GaAs lambda = 904 nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. **Photomed. Laser Surg.**, v.25, n.4, p.245-9, 2007.

COUTINHO, E. L.; DELUCA, C.; SALVINI, T. F.; VIDAL, B.C. Effects of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. **Connect. Tissue Res.**, v.47, n.5, p.278-86, 2006.

COSTA, P.B.; RYAN, E.D.; HERDA, T.J.; WALTER, A.A.; HOGE, K.M.; CRAMER, J.T. Acute effects of passive stretching on the electromechanical delay and evoked twitch properties. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 2009. In press.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A.R.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, n.12, p.1853-61, 2004.

CROOK, T.; MCGOWAN, C.; PEAD, M. Effect of passive stretching on the range of motion of osteoarthritic joints in 10 Labrador retrievers. **Vet. Rec.**, v.160, n.16, p.545-7, 2007.

DANESH, J.; WHEELER, J.G. HIRSCHFELD, G.M.; EDA, S.; ERIKSDOTTIR, G.; RUMLEU, A.; LOWE, G.D.O.; PEPYS, M.B.; GUDNASON, V. C- Reactive Protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 14, p. 1387-97, 2004.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; SALOMATINA, E. V.; YAROSLAVSKY, A. N.; HERMAN, I. M.; HAMBLIN, M. R. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. **Lasers Surg. Med.**, v.39, n. 9, p.706-715, 2007.

DIONNE, R.A.; KHAN, A.A.; GORDON S.M. Analgesia and COX-2 inhibition. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 19, p.63-70, 2001.

DIONÍSIO, V.C.; VOLPON, J.B. Ação do ultra-som terapêutico sobre a vascularização pós-lesão muscular experimental em coelhos. **Rev. Bras. Fisioter.** v.4, n.1, p. 19-25, 1999.

DUARTE, J. **Lesões celulares do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico**. Tese - Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto; Porto, 1993.

EBBELING, C.; CLARKSON, P. Exercise-induced muscle damage and adaptation. **Sports Med.**, v.7, p.207-234, 1989.

ESPOSITO, F.; CE, E.; RAMPICHINI, S.; VEICSTEINAS, A. Acute passive stretching in a previously fatigued muscle: Electrical and mechanical response during tetanic stimulation. **J. Sports Sci.**, 2009. In press.

FAULKNER, J.A.; BROOKS, S.V.; OPITECK, J.A. Injury to skeletal muscle fibers during contractions: conditions of occurrence and prevention. **Phys. Ther.**, v. 73, p. 911-921, 1993.

FAROUK, A.H.; BERNARD, L.A. Laser photons and pharmacological treatments in wound healing. **Laser Ther.**, v.12, p. 3-11, 2001.

FIKÁCKOVÁ, H.; DOSTÁLOVÁ, T.; NAVRÁTIL, L.; KLASCHKA, J. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular joint disorders: a placebo-controlled study. **Photomed. Laser Surg.**, v.25, n.4, p.297-303, 2007.

FIKACKOVA, H.; DOSTALOVA, L.; VOSICKA, R.; PETEROVA, V.; NAVRATIL, L.; LESAK, J. Arthralgia of the temporomandibular joint and low-level laser therapy. **Photomed. Laser Surg.**, v. 24, n. 4, p. 522-7, 2006.

FISHER, B.D.; RENNIE, S.; WARREN, S.; MAGEE, D.; KOH, J. The effects of low power laser therapy on muscle healing following acute blunt trauma. **J. Phys. Ther. Sci.**, v.12, p. 49-55, 2000.

FRIDÉN, J.; SFAKIANOS, P.; HARGEN, A. Muscle soreness and intramuscular fluid pressure: comparison between eccentric and concentric load. **J. Appl. Physiol.**, v.6, p. 2175-2179, 1986.

FOEGH, M. L.; RAMWELL, P. W. Os eicosanóides: Prostaglandina, tromboxanos, leucotrienos e compostos relacionados. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 273-285.

FOLEY, J. M. et al. Measurements of muscle damage and adaptation after eccentric exercise. **J. Appl. Physiol.**, v.87, p.2311-2318, 1999.

FU, S.; RAMANUJAM, K.S.; WONG, A.; FANTRY, G.T.; DRACHENBERG, C.B.; JAMES, S.P.; MELTZER, S.J.; WILSON, D.T. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter Pylori* gastritis. **Gastroenterology**, v.116, p. 1319, 1999.

GAJDOSIK, R.L. Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications. **Clin. Biomech.**, v.16, p.87-101, 2001.

GARRETT JÚNIOR, W.E. Muscle strain injuries. **Am. J. Sports Med.**, v.24, n.6, p.2-8, 1996.

GENOVESE, W.J. **Revisão Laser**: São Paulo: Pancast, 2000.

GILROY, D.W., COLVILLE-NASH, P.R., WILLIS, D., CHIVERS, J., PAUL-CLARK, M.J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nat. Med.**, v. 5, p. 698, 1999.

GOULD, C.; WATTS, S.W.; AND WEBB, R.C. Photorelaxation is not attenuated by inhibiting of the nitric oxide- c GMP pathway. **J. Vasc. Res.**, v.33, p. 299-307, 1996.

GOLDMAN, L. **The biomedical laser**: technology e clinical applications. New York: Springer Verlag, 1981, p. 5-25.

GOMES, A. R. S.; CORNACHIONE, A.; SALVINI, T. F.; MATTIELLO-SVERZUT, A. M. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **J. Anat.**, v.209, p.328-335, 2007.

GOMES, A. R.; CORNACHIONE, A.; SALVINI, T. F.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **J. Anat.**, v.210, n.3, p.328-35, 2007.

GONZÁLEZ, M.V.; CRUAÑAS, J.C. Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos, en especial el laser de baja potencia. **Centro de Documentación Laser de Meditec S/A**, Barcelona; p. 6-21, 1988.

GWOZDZIEWICZOVÁ, S. TNF- α in the development of insulin resistance and other disorders. **Biomed. Pap. Med. Hypotheses**, v. 67, n. 4, p. 768-773, 2006.

HAUSSINGER, D. et al. Cellular Hydration State: An important determinant of protein catabolism in health and disease. **Lancet**, v.341, p.1330-1332, 1993.

HERMAN, J.H.; KHOSLA, R.C. Nd: YAG laser modulation of synovial tissue metabolism. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v.7, p. 505-12, 1989.

HEUSSLER, J. K.; HINCHEY, G. MARGIOTTA, E.; QUINN, R.; BUTLER, P.; MARTIN, J.; STURGES, A. D. A double blind randomised trial of low power lasere treatment in reumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.52, p. 703-706, 1993.

HIKI, K.; HATTORI, R.; KAWAI, C.; YUI, Y. Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum. **J. Biochem.**, 111: 556-558, 1992.

HONMURA, A. A. *et al.* "Analgesic effect of GaAlAs diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers Surg. Med.**, v.13, p.463-9, 1993.

HONG, E.G.; KO, H.J.; CHO, Y.R.; KIM, H.J.; MA, Z.; YU, T.Y.; FRIEDLINE, R.H.; KURT-JONES, E.; FINBERG, R.; FISCHER, M.A.; GRANGER, E.L.; NORBURY, CC.; HAUSCHKA, S.D.; PHILBRICK, W.M.; LEE, C.G.; ELIAS, J.A.; KIM, J.K. Interleukin-10 Prevents Diet-Induced Insulin Resistance by Attenuating Macrophage and Cytokine Response in Skeletal Muscle. **Diabetes**, 2009. In press.

HUANG, H.H., QUESHI, A. A.; BIUNDO JR., J. J. Sports and other soft tissue injuries, tendinitis, bursitis, and occupation-related syndromes. **Current. Opinion rheumatology**, v.12, p.150-154,2000.

INOUE, T.; SUZUKI, S.; HAGIWARA, R.; IWATA, M.,; BANNO, Y.; OKITA, M. Effects of passive stretching on muscle injury and HSP expression during recovery after immobilization in rats. **Pathobiology**, v. 76, n. 5, p.:253-9, 2009.

IRRGANG, J. J. Rehabilitation. In: FU, F. H.; STONE D. A. (Ed.). **Sports Injuries**. 2^a ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1993.

IVANDIC, B.T.; IVANDIC, T. Low-level laser therapy improves vision in patients with age-related macular degeneration. **Photomed. Laser Surg.**, v. 26, n.3, p.241-5, 2008.

JACOBS, T.L.; SEGAL, S.S. Attenuation of vasodilatation with skeletal muscle fatigue in hamster retractor. **J. Physiology**, v.524, n.3, p.929-941, 2000.

JÄRVINEN, M. Healing of a crush injury in rat striated muscle: estudy of the effect of early mobilization and immobilization on the repair processes. **Acta Path. Micorbiol. Scand.**, v. 83, p. 269-282, 1975.

JÄRVINEN, T.A.; JÓZSA, L.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, T.L.; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **J. Muscle Res. Cell. Motil.**, v. 23, n. 3, p. 245-54, 2002.

JONES, M.K.; WANG, H.; PESKAR, B.M.; LEVIN, E.; ITANI, R.M.; SARFEH, I.J. TARNAWSKI, A.S. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. **Nat. Med.**, v. 5, p. 1418, 1999.

KARU, T. Low-power laser therapy. In: VO DINH, T. **Biomedical photonics handbook**. North Carolina: Taylor and Francis Group, 2003.

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

KARU, T. I.; Phobobiological fundamental of low power laser therapy. **IEEE J. Quant. Elect.**, v. 23, p.1703, 1987.

KARU, T.I.; AFANAS'EVA, N.I.; KOL'IAKOV, S.F.; PIATIBRAT, L.V. Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation. **Dokl. Akad. Nauk.**, v. 360, n.2, p.267-70, 1998.

KARU, T.I.; PIATIBRAT, L.V.; TIFLOVA, O.A.; NIKOGOSIAN, D.N. Specificity of the lethal and mutagenic actions of pico-second laser pulses of 532-nm wavelength, **Radiobiologia**, v.28, n.4, p.499-502, 1988.

KILÍK, R.; BOBER, J.; GÁL, P.; VIDINSKÝ, B.; MOKRÝ, M.; LONGAUER, F.; SABO, J. The influence of laser irradiation with different power densities on incisional wound healing in healthy and diabetic rats. **Rozhl. Chir.**, v.86, n.7, p.384-7, 2007.

KIM, J. W.; KWON, O. Y.; KIM, M. H. Differentially expressed genes and morphological changes during lengthened immobilization in rat soleus muscle. **Differentiation**, v.75, p. 147-157, 2007.

KIPSHIDZE, N.; KEELAN, M.H.; PETERSEN, J.R.; BACHUTASHVILI, I. Photoactivation of vascular iNOS and elevation of cGMP in vivo: possible mechanism for photorelaxation and inhibition of restenosis an atherosclerotic rabbit mode. **Photochem. Photobio.**, v.741, p.572-582, 2000.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. Inflamação Aguda e Crônica. In: _____. **Patologia Básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 21-39.

LAPOINTE, B. M.; FRÉMONT, P.; CÔTÉ, C. H. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment duration and time of onset on recovery from exercise-induced muscle damage in rats. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v.84, p.651-655, 2003.

LABAT, R. L.; AIMBIRE F. S.C.; PRIANTI JR, A. C.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; LIMA, M. O.; SOUZA, F. B.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Effect of Low Power Ga-Al-As Laser Radiation (650 nm) on the

skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **Lasers Med. Science**, v.17, n.4, p.A35-A35, 2002.

LAROCHE, D. P.; CONNOLLY, D. A. J. Effects of stretching on passive tension and response to eccentric exercise. **Am. J. Sports Med.**, v. 34, n.6, p.1000-1007, 2007.

LEAL JUNIOR, E.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; VANIN, A.A.; BARONI, B.M.; GROSSELLI, D.; DE MARCHI, T.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Lasers Med. Sci.**, 2008. In press.

LEE, G.; WONG, E.; MASON, D.T. New concepts in pain management and in the application of low-power laser for relief of cervicothoracic pain syndromes. **Am. Heart J.**, v.132, n.6, p.1329-34, 1996.

LIRA, F.S.; KOYAMA, C.H.; YAMASHITA, A.S.; ROSA, J.C.; ZANCHI, N.E.; BATISTA, M.L.; SEELAENDER, M.C. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 27, n. 7, p. 458-61, 2009.

LIU, X.G.; ZHOU, Y.J.; LIU, T.C.; YUAN, J.Q. Effects of Low-Level Laser Irradiation on Rat Skeletal Muscle Injury after Eccentric Exercise. **Photomed. Laser Surg.**, 2009. In press.

LOPES-MARTINS, R.A.; MARCOS, R.L.; LEONARDO, P.S.; PRIANTI, A.C.; MUSCARÁ, M.N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J. Appl. Physiol.**, v.101, n.1, p.283-8, 2006.

LOPES-MARTINS, R.A.; ALBERTINI, R.; LOPES-MARTINS, P.S.; DE CARVALHO, F.A.; NETO, H.C.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Steroid receptor antagonist mifepristone inhibits the anti-inflammatory effects of photoradiation. **Photomed. Laser Surg.**, v.24, n.2, p.197-201, 2006.

LOPES-MARTINS, R.A.; ALBERTINI, R.; MARTINS, P.S.; BJORDAL, J.M.; FARIA NETO, H.C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, n.4, p.377-81, 2005.

MA, L.; DEL SOLDATO, P.; WALLACE, J.L. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: shifting the angiogenic balance. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 99, p.13243, 2002.

MACINTYRE, D.L.; REID, W.D.; LYSTER, D.M.; SZASZ, I.J.; MACKENZIE, D.C. Presence of WBC, decreased strength, and delayed soreness in muscle after eccentric exercise. **J. Appl. Physiol.**, v.80, p.1006-1013, 1996.

MAGALHÃES, J. **Exercícios físicos inabituais e exaustivos em crianças. Influência do tipo predominante de contrações em indicadores indirectos de stress oxidativo e de agressão/lesão muscular esquelética.** Mestrado - Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação física da Universidade do Porto, Porto, 1996.

MAGALHÃES, P. **Alterações hematológicas agudas induzidas por diferentes protocolos de exercício físico exaustivo e inabitual.** Mestrado - Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação física da Universidade do Porto, Porto, 2000.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, p.493, 1960.

MATSUMOTO, M.A.; FERINO, R.V.; MONTELEONE, G.F.; RIBEIRO, D.A. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. **Lasers Med. Sci.**, 2008. In press.

MARTIN, R. Laser-accelerated inflammation/pain reduction and rearing. **Pract. Pain Manag.**, v.3, n.6, p. 20-25, 2003.

MEADOR, B.M.; HUEY, K.A. Glutamine preserves skeletal muscle force during an inflammatory insult. **Muscle Nerve**, 2009. In press.

MEDRADO, A.R.; PUGLIESE, L.S.; REIS, S.R.; ANDRADE, Z.A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg. Med.**, v.32, p.239-244, 2003.

MEIJER, F.; TAK, C.; VAN HAERINGEN, N. J.; KIJLSTRA, A. Interaction between nitric oxide and prostaglandin synthesis in the acute phase of allergic conjunctivitis. **Prostaglandins**, v. 52, p. 43 í-446, 1996.

MERRICK, M.A. Secondary injury after musculoskeletal trauma: a review and update. **J. Athl. Train.**, v.2, n. 37, p. 209-217, 2002.

MARQUES, A.P.; VASCONCELOS, A.A.; CABRAL, C.M., SACCO, I.C. Effect of frequency of static stretching on flexibility, hamstring tightness and electromyographic activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 10, p.:949-53, 2009.

DE MEDINACELLI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp. Neurol.**, v.77, p.634-643, 1982.

MINAMOTO, V.B.; GRAZZIANO, C.R.; SALVINI, T.F. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. **Anat. Rec.**, v. 254, n.2, p. 281-7, 1999.

MIZUNO, H.; SAKAMOTO, C.; MATSUDA, K.; WADA, K.; UCHIDA, T.; NOGUCHI, H.; AKAMATSU, T.; KASUGA, M. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. **Gastroenterology**, v.112, p. 387, 1997.

MOITRA, J.; SAMMANI, S.; GARCIA, J. G. Re-evaluation of Evans Blue dye as a marker of albumin clearance in murine models of acute lung injury. **Transl. Res.**, v.150, n.4, p.253-65, 2007.

MOTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 6, p. 109-128.

MOTA, P. **Estudo comparativo dos indicadores indiretos de lesão muscular induzidas pelo exercício em crianças e adultos**. Mestrado - Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto, Porto, 1995.

McCOMAS, A.J. **Skeletal muscle: form and function**. Champaign: Human Kinetics, 1996.

MICKLEY, GA; KANDASAMY, S.B.; HUNT, W.A. Implication of prostaglandins and histamine H1 and H2 receptors in radiation-induced temperature responses of rats. **Radiat. Res.**, v.114, n.1, p.42-53, 1988.

NISHIDA, Y.; SHINOZAKI, T. Resonant wave-particle interactions in vp x B acceleration scheme. **Phys. Rev. Lett.**, v.65, n.19, p. 2386-2389, 1990.

NIEMAN, D. C.; DAVIS, J. M.; HENSON, D.A.; GROSS, S.J.; DUMKE, C.L.; UTTER, A.C.. Muscle cytokine mRNA changes after 2.5h of cycling: influence of carbohydrate. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 37, p. 1283-92, 2005.

NEWHAM, D.J. *et al.* Ultrastructural changes after eccentric and concentric contractions of human muscle. **J.Neurol. Sci.**, v.61, p.109-122, 1983.

NIKOLAOU, P.K.; MACDONALD, B.L.; GLISSON, R.R.; SEABER, A.V.; GARRETT, W.E. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. **A. J. Sports Med.**, v.15, n.1, p.9-14, 1987.

NOONAN, T.J.; BEST, T.M.; SEABER, A.V.; GARRETT, W.E. Identification of a threshold for skeletal muscle injury. **Am. J. Sports Med.**, v.22, n.2, p.257-261, 1994.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P.M. Influence of previous concentric exercise on eccentric exercise-induced muscle damage. **J. Sports Sci.**, v.15, p.477-483, 2001.

PAUSOVA, Z.; DESLAURERS, B.; GAUDERT, D.; TREMBLAY, J.; KOTCHEN, T.A.; LAROCHELLE, P.; COWLEY, A.W.; HAMET, P. Role of tumor necrosis

factor-a gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. **Hypertension**, v. 36, p. 14-19, 2000.

PEVIANI, S. M.; GOMES, A. R.; MOREIRA, R. F.; MORISCOT, A. S.; SALVINI, T. F. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, v.35, n.3, p.363-70, 2007.

PHILIPPOU, A.; MARIDAKI, M.; BOGDANIS, G.; HALAPAS, A.; KOUTSILIERIS, M. Changes in the mechanical properties of human quadriceps muscle after eccentric exercise. **In Vivo**, v. 23, n. 5, p. 859-65, 2009.

PHILIPPOU, A.; BOGDANIS, G.; MARIDAKI, M.; HALAPAS, A.; SOURLA, A.; KOUTSILIERIS, M. Systemic cytokine response following exercise-induced muscle damage in humans. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 47, n. 6, p. 777-82, 2009.

RAJAKARIAR, R.; YAQOOB, M.M.; GILROY, D.W. COX-2 in inflammation and resolution. **Mol. Interv.**, v. 6, v. 4, p.199-207, 2006.

RAKOS, G.; KIS, Z.; NAGY, D.; LUR, G.; FARKAS, T.; HORTOBAGYI, T.; VECSEI, L.; TOLDI, J. Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain. **Acta Neurobiol. Exp.**, Wars, v.67, n.2, p.149-54, 2007.

ROGERO, M. M.; MENDES, R. R.; TIRAPEGUI, J. Síndrome de overtraining. Arq. Bras. **Endocrinol. Metab.**, v. 49, p. 359-68, 2005.

REILLY, T. **Sports Fitness and Sports Injuries**. London. Faber e Faber. 1981.

REDDY, G. K.; GUM, S.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: part II effects of combined laser therapy and electrical stimulation. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.36, n.6, p.794-800, 1998.

RIGAU, J. **Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular**. 1996. Doutorado (Histologia) – Facultad de Medicina i Ciència de la Salut. Univ. Rovira i Virgili, Reus, 1996.

RICCI, R. **Estudo in vitro da bioestimulação de células endoteliais em resposta a diferentes dosimetrias do laser de semicondutor fosfato de índio-gálio-alumínio**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, 2003.

ROBERTS, J. M.; WILSON, K. Effect of stretching duration on active and passive range of motion in the lower extremity. **Br. J. Sports Med.**, v.33, p. 259-263, 2007.

RUBINI, E. C.; COSTA, A, L.; GOMES, P. S. The effects of stretching on strength performance. **Sports Med.**, v.37, n.3, p.213-24, 2007.

SANTOS, R.S. *et al.* Study of the effects of oral administration of L-arginine on muscular performance in healthy volunteers: as isokinetic study. **Isokinetics Exerc. Sci.**, v.10, n.3, p.153-158, 2002.

SATTAYUT, S.; HUGES, F.; BRADLEY, P. 820 nm gallium aluminum arsenide laser modulation of prostaglandin E2 production in interleukin 1 stimulated myoblasts. **Laser Ther.**, v.11, n.2, p.8895, 2000.

SATO, K.; LI, Y.; FOSTER, W.; FUKUSHIMA, K.; BADLANI, N.; ADACHI, N.; USAS, A.; FU, H.; HUARD, J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle fibrosis regeneration and prevention of fibrosis. **Muscle Nerve**, n.3, v.28, p.365-372, 2003.

SCHAWLOW, A. L. Principle of laser Journal of Clin. **Laser Med. Surg.**, v.13, n.3, 1995.

SCHAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; ACHAFER, P. M.; BUCH, M.; REISER, M.; DÜHMKE, E. Effect of 780nm diode laser irradiation on blood microcirculation preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. Photochem. Photobiol. Biol.**, v. 54, p.55-60, 2000.

SHEFER, G.; ORON, U.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A.; HALEVY, O. Skeletal muscle cell activation by lowenergy laser irradiation: A role for the MAPK/ERK pathway. **J. Cell. Physiol.**, v.187, p. 73-80, 2001.

SHEFER, G.; PARTRIDGE, T.A.; HESLOP, L.; GROSS, J.G.; ORON, U. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **J. Cell. Sci.**, v.115, p. 1461-1469, 2002.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHON, H.; SCHINDL, L. Low-intensity laser therapy : a review. **J. Invest. Med.**, v. 48, n.5, p. 312-326, 2000.

SCHMASSMANN, A.; ZOIDL, G.; PESKAR, B.M.; WASER, B.; SCHMASSMANN-SUHIGAR, D.; GEBBERS, J.O.; REUBL, J.C. Role of the different isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in cyclooxygenase-1 and 2-knockout mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.290, p. G747, 2006.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHÖN, H.; SCHINDL, L. Low-intensity laser therapy: a review. **J. Investig. Med.**, v.48, n.5, p.312-326, 2000.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, n. 6, v. 12, p. 1191-7, 2005.

SIN, D.D.; MAN. S.F.P. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiocascular diseases? The potencial role of sustemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Circulation**, v. 107, n. 11, p. 1514-9, 2003.

SKARE, T.L.; SILVA, T.Q.; PASTRO, P.C. Uveitis and spondyloarthritis: prevalence and relationship with joint disease. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 70, n. 5, p. 827-30, 2007.

SLIVKA, D.; RAUE, U.; HOLLON, C., MINCHEV, K., Trappe S. Single muscle fiber adaptations to resistance training in old (>80 yr) men: evidence for limited skeletal muscle plasticity. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 295, n. 1, p. R273-80, 2008.

SMIT, E.; PRETORIUS, E.; ANDERSON, R.; OOMMEN, J.; POTJO, M. Differentiation of human monocytes in vitro following exposure to Canova in the absence of cytokines. **Ultrastruct. Pathol.**, v. 32, n. 4, p.147-52, 2008.

STERGIOULAS, A.; STERGIOULA, M.; AARSKOG, R.; LOPES-MARTINS, R.A.; BJORDAL, J.M. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. **Am. J. Sports Méd.**, v. 36, n. 5, p.881-7, 2008.

SOARES, J.; DUARTE, J. Miopatia do exrcício. Etiologia, fisiopatologia e fatores de prevenção. **Rev. Port. Med. Desp.**, v.7, p.187-200, 1989.

SVAASAND, L.O. Biostimulation with low-intensity lasers--physics or metaphysics. **Nord. Med.**, v.105, n.3, p,72-5, 1990.

TESTA, M.; ROCCA, B.; SPATH, L.; RANELLETTI, F.O.; PETRUCCI, G.; CIABATTONI, G.; NARO, F.; SCHIAFFINO, S.; VOLPE, M.; REGGIANI, C. Expression and activity of cyclooxygenase isoforms in skeletal muscles and myocardium of humans and rodents. **J. Appl. Physiol.**, v. 103, n. 4, p.1412-8, 2007.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflamtory mechanisms in the vascular wall. **Circ. Res.**, v. 8, 877-887, 2001.

TAYLOR, D.C.; DALTON, J.D.; SEABER, A.V.; GARRETT, W.E. Experimental muscle strain injury – Early functional and structural deficits and the increased risk for reinjury. **A. J. Sports Med.**, v.21, n.2, p.190-193, 1993.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. Inflamação. **Uma revisão do processo**. 4. ed. São Paulo: Quintessence, 1996. 172 p.
TEAGUE, B.N.; SCHWANE, J.A. Effect of intermittent eccentric contractions on symptoms of muscle microinjury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.27, n.10, p.1378-1384, 1995.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 38, p. 97–120, 1998.

VAREJÃO, A. S. P. **Regeneração do nervo periférico: recuperação funcional num modelo experimental**. Doutorado - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Porto, 2003.

VASSELJEN, O. Low-level laser versus traditional physiotherapy in the treatment of tennis elbow. **Physiotherapy**, v.78, n.5, p. 483-91, 1992.

VILLARROYA-APARICIO, A. El laser y el dolor. **Rehabilitación**, v.28, n.5, p. 346-53, 1994.

VIEIRA, W.H.B. *et al.* Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos a treinamento aeróbio em esteira e laser de baixa intensidade. **Rev. Brás. Fisioterapia**, v.10, n.2, p.205-211, 2006.

VOLTARELLI, J.C.; FEBRE E INFLAMAÇÃO in: SIMPÓSIO DE SEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA CLÍNICAS, 1994, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1994. v. 27, n.1, cap. 1, p. 7-48.

WANG, X. *et al.* Overexpression of Human Matrix Metalloproteinase-12 Enhances the development of Inflammatory Arthritis in Transgenic Rabbits. **Am. J. Pathol.**, v. 165, p. 375-83, 2004.

WALLACE, J.L.; BAK, A.; MCKNIGHT, W.; ASFAHA, S.; SHARKEY, K.A. MacNaughton WK. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. **Gastroenterology**, v.115, p.101, 1998.

WARREN, G.L. *et al.* Mechanical factors in the initiation of eccentric contraction-induced injury in rat soleus muscle. **J. Physiol.**, v.464, p.457-475, 1993a.

WEBSTER, N. R.; GALLEY, H. F. Inflammation and immunity. **Br. J. Anaesth.**, v. 3, 54-58, 2003.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level-laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 16, n. 3, p. 159-65, 1998.

XIE, W.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p.2692,1991.

XIONG, .Y.; WU, Y.C.; JIN, H.Z.; GU, Y.H. Randomized controlled trials on the influence and mechanism of manipulation on delayed onset muscle soreness after eccentric exercise. **Zhongguo Gu Shang**, v. 22, n.9, p.669-73, 2009.

YASUDA, S.; IKUTA, K.; UWATOKU, T.; OI, K.; ABE, K.; HYODO, F.; YOSHIMITSU, K.; SUGIMURA, K.; UTSUMI, H.; KATAYAMA, Y.; SHIMOKAWA, H. In vivo Magnetic Resonance Imaging of Atherosclerotic Lesions with a Newly Developed Evans Blue-DTPA-Gadolinium Contrast Medium in Apolipoprotein-E-Deficient Mice. **J. Vasc. Res.**, v.16, n.45, n.2, p.123-128, 2007.

YASUKAWA, A.; HRUI, H.; KOYAMA, Y.; NAGAI, M.; Takakuda, K. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. **J. Vet. Med. Sci.**, v.69, n.8, p.799-806, 2007.

YLINEN, J.; KAUTIAINEN, H.; WIRÉN, K.; HÄKKINEN, A. Stretching exercises vs manual therapy in treatment of chronic neck pain: a randomized, controlled cross-over trial. **J. Rehabil. Med.**, v.39, n.2, p.126-32, 2007.

YOSHIKAI, Y.. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, 257-263, 2001.

YOUSEFI-NOORAIE, R.; SCHONSTEIN, E.; HEIDARI, K.; RASHIDIAN, A.; AKBARI-KAMRANI, M.; IRANI, S.; SHAKIBA, B.; MORTAZ HEJRI, S.; JONAI, A. WITHDRAWN: Low level laser therapy for nonspecific low-back pain. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v.17, n. 4, 2007.