

Universidade Federal de São Carlos

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA



Wouber Héricson de Brito Vieira

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM 780 nm SOBRE A
PERFORMANCE MUSCULAR AERÓBIA DE RATOS EM
TREINAMENTO FÍSICO EM ESTEIRA**

São Carlos - SP

2004

Wouber Héricson de Brito Vieira

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM 780 nm SOBRE A
PERFORMANCE MUSCULAR AERÓBIA DE RATOS EM
TREINAMENTO FÍSICO EM ESTEIRA**

The logo of the Universidade Federal de São Carlos (UFSC) is a large, stylized, grey watermark in the background. It features the letters 'UFSC' in a bold, blocky font. To the right of the letters is a graphic element consisting of a grey vertical bar with a white horizontal line, topped by a glowing orange sphere. A grey curved line arches over the 'UFSC' text.

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia
da Universidade Federal de São Carlos como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Avaliação e Intervenção em
Fisioterapia.**

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto

São Carlos - SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

V658el

Vieira, Wouber Héricksom de Brito.

Efeitos do laser de baixa intensidade em 780nm sobre a performance muscular aeróbia de ratos em treinamento físico em esteira / Wouber Héricksom de Brito Vieira. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

131 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Fisioterapia. 2. Treinamento físico. 3. Citrato sintase. 4. Laser de baixa potência. 5. Limiar anaeróbio. 6. LDH. I. Título.

CDD: 615.82 (20^a)

Wouber Hérickson de Brito Vieira

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE 780 nm SOBRE A
PERFORMANCE MUSCULAR AERÓBIA DE RATOS EM
TREINAMENTO FÍSICO EM ESTEIRA**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 14 / 12 / 2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto – Presidente

DFISIO – Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. André Capaldo Amaral

FISIO - Centro Universitário de Araraquara

Prof. Dra. Heloísa Selistre de Araújo

DCF - Universidade Federal de São Carlos

Essa investigação envolveu os laboratórios de Eletrotermofototerapia – (Departamento de Fisioterapia), de Fisiologia do Exercício – (Departamento de Ciências Fisiológicas) e de Evolução Molecular – (Departamento de Genética e Evolução Molecular), todos pertencentes a UFSCar.

Dedicatória

À toda minha família e meus seletos amigos de Natal, que estão sempre torcendo pelo meu crescimento profissional. É com todo carinho que dedico esse trabalho a vocês.

Agradecimentos especiais

A busca e a conquista dessa etapa, o curso de mestrado, que acaba de se concretizar em minha vida, representa um sonho profissional que almejava desde a época de graduação. Essa caminhada só teve seu início graças, dentre outras pessoas, a três amigos que possibilitaram, através do financiamento das despesas com passagens e estadias, a minha vinda para São Paulo no ano de 2002 para prestar, primeiramente, algumas provas de especialização, onde tive a oportunidade de ser aprovado. Esses amigos são: ***Ivan Daniel, Magno Moreno e Edilene Reis***. Esses três fazem parte da minha história profissional. Muito obrigado!! A partir daí começava a se concretizar a vinda para São Carlos, pois cresci pessoal e profissionalmente e pude contar, com mais dois amigos, ou melhor, “dois caboclos arretados” que foram meus verdadeiros anfitriões: ***Jamilson Brasileiro*** (meu eterno professor com quem vivenciei ou vivencio momentos agradáveis, desde a mesa de um “boteco” no qual fizemos duplas, ele tocando seu animado violão e eu arranhando na percussão, até as discussões de assuntos científicos. Valeu meu amigo. Devo muito a você. Me espelho na sua capacidade profissional) e ***Túlio*** (que apesar do menor contato, pude conhecê-lo mais, e desde Natal já me incentivava a prestar a prova de mestrado na UFSCar. Este foi quem me presenteou, uma bicicleta, o meu atual meio de transporte denominada por ele de marinês. Esses amigos têm um “pedacinho” dessa conquista. Nos encontraremos em breve!!

Pois bem, fui aprovado e, de fato, era aluno da pós-graduação da UFSCar. Assim, gostaria de dividir esse momento de felicidade agradecendo aquelas pessoas que se envolveram de alguma forma para a concretização desse trabalho, sendo elas:

À Deus, por ser o melhor de todos os mestres que existe na humanidade, inclusive em fisioterapia. É o mais sábio e quem nos mostra o caminho do conhecimento a cada dia.

Aos meus familiares, com destaque, a minha querida mãe, ou melhor, "mainha", meus irmãos Wagner e Valéria e meu Tio Haroldo. Adoro todos vocês.

A minha bonequinha querida, companheira e namorada Fabiana. Essa mulher é demais.

Ao meu orientador, Nivaldo Parizotto, por ter acreditado em mim e possibilitado meu crescimento profissional. Além disso, pelo companheirismo e amizade construídos durante esse período de convivência.

À professora Maria Luiza Schwantes não só por ter me aceitado em seu laboratório e assim, possibilitado a realização desse estudo, mas acima de tudo pela orientação sempre em clima de simpatia e companheirismo. Admiro o seu jeito de ser. Desde já, aproveito para agradecer também o seu marido, professor Arno, que se envolveu de alguma forma no estudo e assim, contribui para a melhor elaboração deste e a sua aluna de doutorado, Flávia também pela simpatia e pela facilidade em ajudar o próximo. Aprendi muito com vocês. Acredito que construímos uma grande amizade.

Aos professores Sérgio Perez e Vilmar Baldissera por ter aceitado a parceria e conseqüentemente, disponibilizado o laboratório para realização do estudo.

A Tânia Salvini não só por ter disponibilizado também o seu laboratório, mas também pelo incentivo e carinho demonstrados no decorrer dessa caminhada. Obrigado.

Aos professores Catai e Eliete Luciano pelas sugestões proferidas durante o exame de qualificação, bem como, André Capaldo e Heloísa Selistre que participaram da banca examinadora. Com certeza todos contribuíram para a maior objetividade, clareza e entendimento do estudo.

A professora Vera Tomazella e seu aluno de graduação Ferraudo pela contribuição na parte estatística.

Aos meus "personais training de animais", Conrado, Guilherme e cabeça, pois vivenciaram boa parte do trabalho me ajudando "pra caramba", e as garotas do grupo "alongamento et al": Eliane, Ana Raquel e Carol, pois me ajudaram na retirada dos tecidos dos animais. Valeu galera!!!

Ao Marc e Stuart pela troca de idéias a respeito do trabalho logo em seu início. Vocês me ajudaram dando o "ponta pé" inicial.

Ao Cacau, da fisiologia, pela contribuição nos procedimentos laboratoriais e ao Germano, pela ajuda na elaboração dos filmes.

A todos os colegas do laboratório pela troca de experiências que de alguma forma contribuiu para o meu crescimento.

RESUMO

O presente estudo avaliou as adaptações fisiológicas relativas as atividades das enzimas Lactato Desidrogenase - LDH (glicolítica) e Citrato Sintase - CS (oxidativa) e ao Limiar de Anaerobiose (LA), ao exercício em esteira em ratos submetidos à fotoestimulação por laser de baixa intensidade (780nm) nos principais músculos participantes da marcha. Fizeram parte do estudo 54 ratos machos, jovens (30 dias), Wistar, que foram divididos em quatro grupos: dois permaneceram em repouso: (1) GRC, sendo um deles irradiado (2) GRL, e dois foram submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio em esteira por 5 semanas e a testes de esforços crescentes (3) GEC, sendo um deles irradiado (4) GEL. A irradiação por laser infravermelho foi feita, diariamente, em número de quatro: quadríceps, glúteo máximo, Tibial Anterior (TA) e sóleo, em cada pata traseira, totalizando 8 aplicações por animal/dia, sob os parâmetros: Dose: 3,8 J/cm², Potência: 15 mW, Tempo: 10 segundos, modo contínuo, durante 5 semanas consecutivas. Os testes de esforço crescente foram realizados, uma vez por semana, totalizando 5 avaliações durante as quais foram obtidas amostras de sangue visando a determinação do LA. Nas análises eletroforéticas e espectrofotométricas da LDH e CS, foram utilizadas frações de músculo TA, sóleo e cardíaco retiradas 48 horas após a última sessão de exercício. O laser provocou aumentos do metabolismo aeróbio de 2% à 78%, o exercício de 18% à 75% e suas ações combinadas de 43% à 92%. Aparente ação sistêmica do laser foi detectada em músculo cardíaco, com aumento da atividade da CS e diminuição da atividade LDH. Os grupos GEC e GEL exibiram aumento na velocidade máxima, LA deslocado para um nível de maior esforço e uma ligeira tendência de redução do lactato sérico no decorrer das avaliações. Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, apesar do GEL ter exibido maiores valores. Esses dados sugerem que o treinamento aeróbio em esteira associado ao laser de baixa intensidade possa acarretar adaptações fisiológicas no sentido de aumento na capacidade oxidativa dos animais representada pelo aumento na atividade da CS, diminuição da LDH e maior grau de esforço para a obtenção do LA, fato este, de grande utilidade na prática terapêutica.

Palavras Chaves: laserterapia, performance aeróbia, limiar anaeróbio, LDH, CS, fisioterapia.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Autor: Wouber Héricksen de Brito Vieira

Orientador: Nivaldo Antonio Parizotto

Título: Efeitos do Laser de Baixa Intensidade em 780nm sobre a performance muscular aeróbia de ratos em treinamento físico em esteira.

Dissertação de Mestrado em Fisioterapia

São Carlos, dezembro de 2004.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate relative the physiological adaptation the activities of enzymes Lactate Dehydrogenase – LDH (glycolytic) e Citrate Synthase – CS (oxidative) and to the Anaerobic Threshold (AT), to the exercise in treadmill in rats submitted to the photostimulation for low-intensity laser (780 nm) in the main participant muscles of the march. Fifty-four male Wistar rats had been part of the study. These animals were divided in four groups: Two had remained in rest (1) GRC, being one of them irradiated (2) GRL, and other two were submitted to an aerobic treadmill training program during 5 weeks and to a multistage treadmill test of increasing intensity (3) GEC, being one of them irradiated (4) GEL. The irradiation for infra-red laser (780 nm) was made daily in number of four (quadriceps, maximum glúteo, soleus, tibialis anterior) in each back leg of the animals, totalizing 8 applications for animal/day, using (dose, 3,8 J/cm²; power, 15 mW; time, 10 s, continuous) during 5 weeks consecutives. The multistage treadmill tests of increasing intensity were made once a week totalizing 5 evaluation, in order to obtain blood samples for determination of the AT. In the analyses electrophoretics and spectrophotometric of the LDH and CS muscles samples (soleus, TA and cardiac) were removed 48 hours after the last exercise bout. The laser to promote increase in the oxidative metabolism of 2% a 78%, the exercise of 18% a 75%, and action combined of 43% a 92%; Apparent systemic action of the laser was detected in cardiac muscle with increase in the activity of the CS and reduction of the LDH. The group GEC and GEL showed increase in the maximum speed, in the speed corresponding to the AT and a trend reduction of the blood lactate concentration during the training period. However, no significant difference occurred between two groups though the GEL had shown higher values. These data suggest that the aerobic treadmill-training partner to the low-intensity laser can to promote physiological adaptation in the direction of increase oxidative capacity in the animals, represented by increase of the CS, reduction of the LDH and by the higher degree of effort to reach the Anaerobic Threshold. This similarity has a utility therapeutic practical.

Keywords: lasertherapy, aerobic performance, anaerobic threshold, LDH, CS, physical therapy.

FEDERAL UNIVERSITY OF SÃO CARLOS

PHYSICAL THERAPY POST-GRADUATION PROGRAM

Author: Wouber Hérickson de Brito Vieira

Orientates: Nivaldo Antonio Parizotto

Title: Effects of Low Power Laser in 780nm on muscler aerobic performance of rats on training treadmill

São Carlos, December 2004.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acetil-Coa	= acetil-coenzima A
ADP	= adenosina difosfato
AGL	= ácido graxo livre
AMP	= adenosina monofosfato
AMPK	= proteína 5' – AMP - ativada
ATP	= adenosina trifosfato
C	= creatina
°C	= graus Celsius
Ca ⁺⁺	= íon cálcio
cm	= centímetro
cm ²	= centímetro ao quadrado
CTA	= ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarboxílico)
CP	= creatina fosfato
CS	= citrato sintase
DTT	= dithiothreitol
EDTA	= ácido etilenodiaminotetracético
eV	= elétronvolt
FAD ⁺	= flavina adenina dinucleotídeo oxidada
FADH ₂	= flavina adenina dinucleotídeo reduzida
g	= grama
Ga-As	= laser Arseneto de Gálio
Ga-Al-As	= laser Arseneto de gálio e alumínio
GEC	= grupo Exercício-Controle

GEL	= grupo Exercício-Laser
GRC	= grupo Repouso-Controle
GRL	= grupo Repouso-Laser
h	= hora
H ⁺	= íon hidrogênio
He-Ne	= laser Hélio e Neônio
I	= fibra muscular lenta/oxidativa
Ila	= fibra muscular rápida/oxidativa-glicolítica
Ilb	= fibra muscular rápida/glicolítica
IIIb-CEI-IEC 825-1	= classe 3 da classif. das normas de segurança dos lasers terapêuticos
J/cm ²	= joules por centímetro ao quadrado
K _m	= constante de Michaelis-Menten
L	= litro
LA	= limiar de anaerbiose
Laser	= amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LDH	= lactato desidrogenase
MDH	= malato desidrogenase
min	= minuto
mLDH	= isoforma mitocondrial da enzima lactato desidrogenase
mm	= milímetro
mmoles/L	= milimoles por litro
μmoles.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹	= micromoles de substrato por minuto por miligrama de proteína
mM	= milimolar
mW/cm ²	= miliwatts por centímetro ao quadrado
n	= número da amostra

ηm	= nanômetro
NAD^+	= nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	= nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
O_2	= oxigênio
O_2^-	= ânion superóxido
P	= potência útil
PCr	= fosfocreatina
P_i	= fosfato inorgânico
PDH	= piruvato desidrogenase
PIR	= piruvato
s	= segundo
TRIS	= tris-(hidroximetil)- aminometano
Triton X-10	= octilfenoxipolietoxietanol
Hepes	= ácido etanosulfúrico hidroxietilpiperazina
TA	= músculo tibial anterior
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
$V_{\text{máx}}$	= velocidade máxima
$\text{VO}_2\text{máx}$	= consumo máximo de oxigênio
W	= watts
W/cm^2	= watts por centímetro ao quadrado
λ	= comprimento de onda
%	= porcentagem

LISTA DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1.1 - Esquema da Lei de Arndt-Schultz representando o comportamento dose-resposta à irradiação por Laser.....	29
Figura 1.2 - Componentes da cadeia respiratória com suas respectivas estruturas químicas semelhantes a “sistemas de antenas” e a sua interação com a radiação eletromagnética laser com seus comprimentos de onda.....	32
Figura 1.3 - Representação da célula e seus cromóforos, em destaque a mitocôndria, com os prováveis mecanismos de ação primária e efeitos em curto prazo do laser.....	35
Figura 3.1 - Gaiolas coletivas contendo cinco animais sob ração e água “ <i>ad libitum</i> ”.....	57
Figura 3.2 - Esteira ergométrica contendo 3 partes (a); separada por 7 raias individuais em cada parte (b); dotada de um sistema manual de inclinação de até 20%(c).....	59
Figura 3.3 - Aparelho de laser infravermelho (GaAlAs) com comprimento de onda de 780 nm da Classe IIIb-CEI-IEC 825-1.....	60
Figura 3.4 – Lactímetro modelo: <i>YSI MODEL I500 Sport Lactate Analyzer</i>	60
Figura 3.5 - Espectrofotômetro HP UV-Vis G1107A Diode Array, com unidade ótica modelo 8452-A com controlador de temperatura tipo Peltier.....	61

Figura 3.6 - Tubos “ependorff” contendo as amostras de sangue misturado com o fluoreto de sódio.....	64
Figura 3.7 - Aplicação do laser sobre os músculos sóleo e glúteo, respectivamente utilizando a técnica pontual.....	65
Figura 4.1 - Massa corporal inicial e final dos animais dos 4 grupos estudados.....	73
Figura 4.2 - Massa muscular dos músculos sóleo, TA e cardíaco nos 4 grupos estudados.....	74
Figura 4.3 - Atividade da enzima CS em extratos dos músculos cardíaco (a), sóleo e TA (b) dos quatro grupos estudados.....	76
Figura 4.4 - Atividade da LDH em extratos dos músculos sóleo, TA e cardíaco dos quatro grupos estudados, em 1mM de piruvato.....	78
Figura 4.5 - Atividade da LDH em extratos dos músculos sóleo, TA e cardíaco dos quatro grupos estudados, em 10mM de piruvato.....	78
Figura 4.6 – Efeito do laser (grupo 2), exercício (grupo 3) ou ação de ambos = L + E (grupo 4) sobre a atividade enzimática da CS e LDH nos tecidos analisados em relação ao controle.....	79

- Figura 4.7** – Efeito do laser na presença do exercício = L+E (grupo 4) sobre a atividade enzimática da CS e LDH nos tecidos analisados em relação ao seu controle (grupo 3).....81
- Figura 4.8** - Razões B/A de atividade da LDH (a) e porcentagem da inibição em 10mM (b), para os 3 músculos nos quatro grupos estudados.....83
- Figura 4.9** - Razões de atividade LDH/CS detectados em TA (a), sóleo (b) e coração (c) nos quatro grupos estudados.....87
- Figura 4.10** - Efeito do laser (grupo 2), exercício (grupo 3) e suas ações combinadas (grupo 4) em relação ao seu controle sobre o tipo de metabolismo detectado (a partir das relações de atividade LDH/CS) em coração e sóleo (a) e TA (b).....89
- Figura 4.11** - Efeito do laser na presença do exercício (grupo L+E ou 4) em relação ao seu controle (grupo 3) sobre o tipo de metabolismo detectado (a partir das relações de atividade LDH/CS) em coração e sóleo (a) e TA (b).....90
- Figura 4.12** – Pontos visuais finais das isoformas da LDH detectado em extratos de músculos sóleo (a), TA (b) e cardíaco (c) de animais do GEL.....92
- Figura 4.13** - Velocidade máxima durante as cinco avaliações do teste de esforço crescente e intervalado nos grupos submetidos ao exercício (a) e ao exercício e laser (b).97

- Figura 4.14** - Velocidade no momento do LA durante as cinco avaliações do teste de esforço crescente e intervalado nos grupos submetidos ao exercício **(a)** e ao exercício e laser **(b)**.....98
- Figura 4.15** - Velocidade máxima da corrida e velocidade no momento do LA durante as cinco avaliações do teste de esforço crescente e intervalado nos grupos submetidos ao exercício **(a)** e ao exercício e laser **(b)**.....100
- Figura 4.16** - Concentração de lactato sérico no momento do LA durante as cinco avaliações do teste de esforço crescente e intervalado nos grupos submetidos ao exercício **(a)** e exercício + laser **(b)**.....101
- Figura 4.17** - Concentração de lactato sérico em relação ao aumento do esforço (curva de lactato sérico x esforço) dos animais dos grupos submetidos ao exercício **(a)** e exercício + laser **(b)**.....102

LISTA DE QUADROS

- Quadro 4.1** – Pontos visuais finais das isoformas da LDH nos três músculos para cada um dos quatros grupos de ratos a partir do método de diluições seriadas de Klebe (1975).....94
- Quadro 4.2** –Variação da expressão dos locos duplicados da LDH em músculos sóleo, TA e cardíaco nos quatros grupos de ratos analisados.....95
- Quadro 4.3** – Atividades dos produtos do locus *LDH-B** em relação ao do locus *LDH-A**, calculadas a partir das proporções detectadas pelo método de Klebe (1975)...95

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1** - Parâmetros (metas) pré-determinados do treinamento realizado pelos animais dos grupos 3 e 4.....72

SUMÁRIO

	Págs.
1 – INTRODUÇÃO.....	20
1.1 – Delimitação do problema.....	20
1.2 – Justificativa.....	23
1.3 – Revisão da Literatura.....	24
1.3.1 – Laser de baixa intensidade.....	24
1.3.2 – Mitocôndrias.....	36
1.3.3 – Fisiologia do exercício.....	37
1.3.3.1 – Metabolismo do exercício e bioenergética.....	38
1.3.3.2 – Limiar de anaerobiose e metabolismo do lactato.....	42
1.3.3.3 – Adaptações metabólicas ao treinamento aeróbio.....	46
1.3.4 – Enzimas e potenciais metabólicos.....	49
1.3.4.1 – LDH.....	51
1.3.4.2 – CS.....	53
2 – OBJETIVOS.....	56
2.1 – Objetivo geral.....	56
2.2 – Objetivos específicos.....	56
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1 – Animais.....	57
3.2 – Procedimentos.....	57
3.3 – Instrumentação.....	59
3.4 – Pré-treinamento.....	61
3.5 – Treinamento aeróbio.....	62
3.6 – Teste de esforço.....	62

3.7 – Coleta de amostras de sangue e dosagem do lactato.....	63
3.8 – Irradiação por laser de baixa intensidade.....	64
3.9 – Enzimas.....	65
3.9.1 – Preparação dos extratos de tecidos.....	66
3.9.2 – Ensaio enzimáticos e medida de concentração proteica.....	67
3.9.3 – Eletroforese em gel de amido.....	68
3.9.3.1 – Detecção das isoformas da LDH.....	69
3.9.3.2 – Quantificação das intensidades relativas das isoformas da LDH pelo método de Klebe (1975).....	69
3.10 – Tratamento e análise dos dados.....	71
4 – RESULTADOS.....	72
4.1 – Caracterização dos animais.....	72
4.1.1 – Corrida na esteira.....	72
4.1.2 – Massa corporal.....	73
4.1.3 – Massa muscular.....	74
4.2 – Respostas metabólicas à irradiação por laser.....	74
4.2.1 – Atividade da LDH e CS.....	74
4.2.2 – Razão B / A.....	82
4.2.3 – Razão LDH / CS.....	85
4.3 – Expressão dos loci da LDH obtidos por eletroforese / espectrofotometria	91
4.4 – Dosagem de lactato.....	96
5 – DISCUSSÃO.....	103
6 – CONCLUSÕES.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
ANEXOS.....	130

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Delimitação do problema

O laser de baixa intensidade é uma modalidade terapêutica eletromagnética relativamente nova, obtida a partir de um mecanismo especial de emissão, que o fisioterapeuta pode usufruir para o tratamento de seus pacientes (ORTIZ *et al.*, 2001). Há algum tempo, estudiosos têm expressado sobre a interação e influência entre radiações eletromagnéticas, como o laser, e sistemas biológicos, como tecido, organelas e células isoladas, no tratamento de enfermidades com o objetivo principal de diminuição de processos inflamatórios e dolorosos, bem como, de cicatrização e reparação tecidual (BAXTER, 1997) ou na estimulação da taxa de respiração celular mediante modificações mitocondriais (KARU, 1987, 1998; KARU; PYATIBRAT; KALENDU, 1995; MORIMOTO *et al.*, 1994; PASSARELA *et al.*, 1984; PASSARELA *et al.*, 1988; PASTORE *et al.*, 1996; WILDEN; KARTHEIN, 1998; YU *et al.*, 1997).

Particularmente sobre estimulação do metabolismo energético Karu (1998); Manteifel, Bakeeva e Karu (1997); Salet, Passarela e Quagliariello (1987); Yu *et al.* (1997), sugerem, pois, que em células irradiadas, os primeiros eventos fotoquímicos e fotofísicos acontecem nas mitocôndrias, cujas alterações respiratórias são explicadas como resultado tanto de mudanças estruturais (BAKEEVA *et al.*, 1993; MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997), quanto de alterações químicas (metabólicas) nessas organelas citoplasmáticas, podendo estas ser no potencial de membrana (PASSARELA *et al.*, 1984; PASSARELA *et al.*, 1988) e/ou em atividades enzimáticas (KARU, 1998, 1987; MORIMOTO *et al.*, 1994; PASTORE *et al.*, 1996; WILDEN; KARTHEIN, 1998), todas contribuindo para a maior disponibilidade de energia para a realização das atividades celulares bem como para o maior uso da via

metabólica aeróbia (KARU, 1987; QUARTO *et al.*, 1988; VACCA *et al.*, 1993; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

Considerando as modificações estruturais após irradiação por laser Manteifel, Bakeeva e Karu (1997); Bakeeva *et al.* (1993), evidenciaram a formação de mitocôndrias gigantes a partir da fusão das membranas de mitocôndrias vizinhas e menores, de tal forma que aquelas seriam capazes de proporcionar altos níveis de respiração e energia de reposição. Por outro lado, um mecanismo químico baseado na ativação e/ou mudança do potencial redox de determinados componentes da cadeia respiratória mitocondrial (citocromo C oxidase e NADH desidrogenase) parece ser crucial na determinação desse efeito sobre a bioenergética (KARU, 1987, 1999; MORIMOTO *et al.*, 1994; PASTORE *et al.*, 1994; QUARTO *et al.*, 1988).

Além dos efeitos do laser sobre o metabolismo energético, é sugerido na literatura científica (BLAIR *et al.*, 1994; POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001), que o treinamento de *endurance* também promove mudanças nas características estruturais e metabólicas das mitocôndrias, favorecendo o uso da via aeróbia em detrimento da anaeróbia durante o exercício. Alguns dos estudos averiguando o efeito do exercício sobre a performance aeróbia têm utilizado análises de atividade enzimática (HALSBERGHE, 2003; LEEK *et al.*, 2001; SIU *et al.*, 2003), bem como, de dosagem de lactato plasmático (McDERMOTT; BONEN, 1993; MOLINARI; SANTOS, 2001).

Assim, o laser de baixa intensidade pode ser um coadjuvante do exercício no aumento da capacidade aeróbia e condicionamento físico de indivíduos, tendo em vista que os achados referentes às adaptações musculares ao treinamento aeróbio se assemelham a alguns dos efeitos do laser de baixa energia sobre o metabolismo oxidativo das células musculares. No entanto, estudos *in vivo*, devidamente controlados, investigando tais benefícios do laser em seres submetidos a um treinamento aeróbio são escassos. Dessa forma, o presente estudo se propõe analisar as possíveis adaptações fisiológicas musculares relativas à atividade das

enzimas LDH e CS e ao limiar de anaerobiose, em resposta ao exercício aeróbio em esteira em ratos submetidos a fotoestimulação por laser de baixa intensidade (780 nm) nos principais músculos participantes da marcha.

1.2 – Justificativa

Os estudos que envolvem o laser de baixa intensidade têm se concentrado, predominantemente, na modulação de certos processos biológicos, em especial a fotobioestimulação do processo de cicatrização e reparo dos tecidos (MESTER; MESTER; MESTER, 1985). Atualmente, essa modalidade vem sendo desenvolvida e estudada em laboratórios, bem como, utilizada em outros campos da fisioterapia, de modo que são muitos os casos em que sua aplicação é indicada. Entretanto, apesar dessa relativa utilização, sua aplicação não resulta em explicar facilmente seu funcionamento, de modo que os reais efeitos sobre os tecidos e o mecanismo primário de ação da luz sobre as moléculas fotoceptoras ainda não tem sido estabelecidos. Além dos diferentes procedimentos metodológicos, os parâmetros manipuláveis clinicamente nos aparelhos de laser não seguem um padrão uniforme. Como resultado, surge uma enorme divergência nas conclusões enunciadas a partir desses experimentos.

Não é de hoje que se sabe da relação entre a irradiação por laser de baixa intensidade e as respostas mitocondriais frente a essa estimulação no aumento da taxa energética e síntese de ATP. No entanto, quase todos os estudos realizados nessa linha de pesquisa foram desenvolvidos em culturas de células e em mitocôndrias isoladas (*in vitro*), sendo a menor parte realizados em animais de experimentação (*in vivo*). Além disso, não há relatos na literatura científica de estudos investigando o efeito conjunto do laser e atividade física sobre a performance aeróbia. Assim, baseado nos benefícios do laser sobre o metabolismo aeróbio obtido nesses estudos isolados, torna-se possível e importante a realização de estudos *in vivo*, bem controlados, investigando os efeitos do laser sobre a performance aeróbia em animais de experimentação, no sentido de contribuir para uma fundamentação das reais possibilidades fisiológicas desse recurso eletromagnético.

1.3 – Revisão da literatura

1.3.1 – Laser de baixa intensidade

CONCEITUAÇÃO E REVISÃO HISTÓRICA

O termo LASER é uma abreviatura do inglês: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* que significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”, sendo este o princípio em que foi baseada sua criação. Ele constitui-se em uma radiação eletromagnética específica obtida a partir de um mecanismo especial de emissão, em que determinada substância é estimulada a emitir radiação, a partir do fornecimento de energia aos seus átomos. Dependendo do tipo de substância estimulada serão obtidos diferentes tipos de laser, com respectivos comprimentos de onda e frequência, visíveis ou não, fator este dependente da situação dentro do espectro de visibilidade do ser humano (faixa espectral ou espectro eletromagnético) (AMESTOY, 1995; KITCHEN; BAZIN, 1996; LOW; REED, 2001; TUNER; HODE, 1999).

O fenômeno físico da emissão estimulada de radiação foi postulado por Albert Einstein em 1916. No entanto, o ímpeto para o descobrimento dos diferentes tipos de laser, se deu em 1958, quando Townes e Schawlow propuseram um modelo para o desenvolvimento de um laser propriamente dito (ORTIZ *et al.*, 2001; TUNER; HODE, 1999).

Em 1960, Theodore Maiman produziu o primeiro feixe de luz laser de material sólido nos Estados Unidos, utilizando o cristal de rubi com comprimento de onda na faixa vermelha do espectro eletromagnético. As décadas subseqüentes foram marcadas pelo desenvolvimento de vários aparelhos de laser, baseados no protótipo original de Maiman, encontrando aplicações variadas, como por exemplo, na área industrial (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996; TUNER; HODE, 1999).

A partir desse momento, os lasers apresentaram uma aplicação imediata na área médica, especificamente na cirurgia, apresentando como característica o fato de ser de alta potência, do inglês: *high reactive-level laser treatment* (HLLT), tomando por base os efeitos fototérmicos e fotodestrutivos sobre o tecido, sendo utilizados, pois, para cortar, coagular, e mesmo destruir tecidos (KARU, 1999, 2000; KITCHEN; BAZIN, 1996).

Mais recentemente, os pesquisadores voltaram-se para as possíveis aplicações clínicas atérmicas (baixas potências e energia) do laser sobre os tecidos, baseados em seu efeito na modulação de processos biológicos (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

Nos últimos anos, a introdução de fotodiodos emissores de laser pequenos e compactos promoveu um recrudescimento no uso desta terapia, conhecida no ocidente como laserterapia de baixo nível, ou de baixa intensidade (TLBI), do inglês: *low-level laser treatment* (LLLT), por este efeito biomodulatório nos tecidos (BASFORD, 1989; BAXTER, 1991).

Na fisioterapia, as pesquisas têm se concentrado particularmente na fotobioestimulação do processo de cicatrização e reparo dos tecidos. No entanto, não há ainda um consenso na literatura especializada sobre os reais efeitos desse recurso terapêutico, existindo divergências entre os diversos estudos e seus autores.

Assim, observa-se que desde sua invenção, essa modalidade vem sendo desenvolvida e estudada em laboratórios e na prática terapêutica clínica, bem como, sendo utilizada em vários campos como indústria, medicina e fisioterapia, o que tem contribuído cada vez mais para o melhor entendimento de seus princípios e aplicabilidades.

CARACTERÍSTICAS DA RADIAÇÃO LASER

A luz laser apresenta características especiais que a diferenciam das outras modalidades luminosas e que estão relacionadas ao processo de sua produção, ou seja, a

emissão estimulada de radiação, sendo elas: 1. a monocromaticidade; 2. a colimação; 3. a coerência; 4. a polarização.

A monocromaticidade indica que a luz tem uma só cor e que o meio que gera a radiação vai corresponder, na grande maioria das vezes, a um único comprimento de onda (λ). Esta característica determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente, contribuindo para o melhor entendimento da interação fotobiológica e dos efeitos terapêuticos específicos. A colimação consiste no alto grau de paralelismo do feixe laser indicando a ínfima capacidade de divergência, de tal forma que a luz mantém um pequeno tamanho de saída do feixe por uma longa distância. Esta característica é responsável pelos perigos oculares produzidos por esse tipo de radiação luminosa, com exceção dos diodos semicondutores. A coerência consiste no sincronismo dos fótons de luz no espaço (coerência espacial) e no tempo (coerência temporal), sem ocorrer interferência entre eles, ou seja, apresentam a mesma fase. A polarização é outra característica adicional que pode estar presente nos lasers e que corresponde à orientação em um só plano das ondas de luz, de forma que as vibrações em seus campos elétricos acontecem numa só direção. Esta característica determina a emissão de fótons de maneira unidirecionais e paralelos entre si (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996; LOW; REED, 2001; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004; TUNER; HODE, 1999).

PRINCÍPIOS GERAIS DOS EQUIPAMENTOS DE LASER

A radiação laser é produzida quando um átomo se encontra no seu estado excitado, cujos elétrons podem retornar para níveis mais baixos de energia a partir da estimulação (colisão) por um fóton incidente. Quando o elétron sofre esse salto quântico e retorna para a sua órbita original ele emite um fóton de luz com as mesmas características do fóton incidente. Esse fenômeno caracteriza a emissão estimulada de radiação, o qual sofre um efeito

de amplificação, proporcionando uma grande quantidade de fótons idênticos através da rápida excitação do meio gerador da radiação (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996; LOW; REED, 2001).

A quantidade de energia liberada na forma de um fóton, cuja unidade é dada em elétronvolt (eV), determinará o comprimento de onda (λ) da luz emitida, os quais apresentam uma relação inversamente proporcional, ou seja, curtos comprimentos de onda estão relacionados com fótons carregando altas quantidades de energia (BAXTER, 1997).

A grande variabilidade de carga energética dos fótons determina a existência de uma vasta quantidade de radiações, que passaram a ser classificadas dentro de um espectro eletromagnético. Os lasers terapêuticos mais usados na prática clínica e laboratorial encontram-se em uma faixa de espectro variando entre o visível e infravermelho, com destaque para o de hélio-neônio (He-Ne), na faixa do visível, e os de arseneto de gálio (Ga-As) e arseneto de gálio e alumínio (Ga-Al-As), também denominados de semicondutores ou diódico, com emissão na faixa do infravermelho ou visível. O intervalo espectral mais utilizado se encontra entre os comprimentos de onda de 630 e 1300 nm (nanômetro), constituindo a chamada “janela terapêutica” para tecidos biológicos (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996; KITCHEN; PARTRIGDE, 1991; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004).

Uma vantagem da aplicação da radiação na faixa do infravermelho próximo (700 a 900 nm) quando comparada com a na faixa do visível, é a sua maior penetração nos tecidos tendo em vista aquela ser pouco absorvível pelo componente aquoso e pela hemoglobina presentes na superfície tecidual (KITCHEN; BAZIN, 1996; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004).

DOSE E PARÂMETROS DA IRRADIAÇÃO

Diversos são os parâmetros que descrevem os equipamentos de laser, os quais são: o comprimento de onda, a potência útil, a densidade de potência (ou irradiância), a densidade de

energia (dose ou fluência), o modo e tipo do feixe e a frequência de tratamento (KITCHEN; BAZIN, 1996; LOW; REED, 2001; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004; TUNER; HODE, 1999).

1. Comprimento de onda (λ): consiste na distância entre dois picos (ponto mais alto) ou dois vales (ponto mais baixo) de uma onda, ou seja, é a distância percorrida por um ciclo, cuja unidade que o representa é uma fração do metro, expressa em nanômetros (nm). Este parâmetro é considerado o fator determinante dos efeitos fisiológicos, pois determina quais biomoléculas absorverão a radiação, cuja faixa ótima se estende desde o visível até o infravermelho próximo (BAXTER, 1997; KARU, 1998; KITCHEN; BAZIN, 1996; LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993).

2. Potência útil (P): consiste na energia emitida em um segundo, cuja unidade é comumente expressa em watts (W) ou em miliwatts (mW). Os lasers terapêuticos normalmente operam em potências de saída inferiores a 1W. Um laser será mais potente quanto maior for a energia gerada por segundo, tendo em vista que a efetividade da radiação laser se baseia na quantidade suficiente de energia. No entanto, não existem dados conclusivos a respeito da potência ideal a ser usada (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004).

3. Densidade de potência (ou irradiância): consiste na potência de saída da luz por área de irradiação, cuja unidade é expressa em mW/cm^2 ou W/cm^2 . Este parâmetro comumente é mantido ao nível mais alto quando se utiliza a técnica “em contato” (superfícies em tratamento pressionadas firmemente pelo aplicador da fibra óptica), tendo em vista a ocorrência de maior concentração de fótons por unidade de área quando comparada ao uso sem contato com o tecido alvo (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996).

4. Densidade de energia (dose ou fluência): consiste na energia total transmitida por um feixe laser por unidade de área, cuja unidade é expressa em J/cm^2 . Para calcular a dose utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Densidade de energia (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência (W)} \times \text{Tempo (s)}}{\text{Área de irradiação(cm}^2\text{)}}$$

A dose ideal da radiação laser depende de vários fatores, dentre eles: a distância entre a pele e o aplicador laser, do sistema óptico do aparelho, da profundidade do tecido, das características que são inerentes à irradiação por laser sobre o tecido alvo, ou seja, reflexão, refração, dispersão, transmissão e absorção do feixe, bem como, do tecido a ser irradiado e seu estado fisiológico prévio (BAXTER, 1997; BECKERMAN *et al.*, 1992).

De acordo com alguns autores (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996; LOW; REED, 2001), acredita-se que exista uma “janela terapêutica” para uma fotoestimulação efetiva acima de um valor limiar, porém abaixo de um valor que ocasione uma fotoinibição. Esta hipótese foi descrita como Lei de Arndt-Schultz, a qual prediz a existência de um efeito dose-dependente representado por uma curva dose *versus* resposta biológica (Figura 1.1).

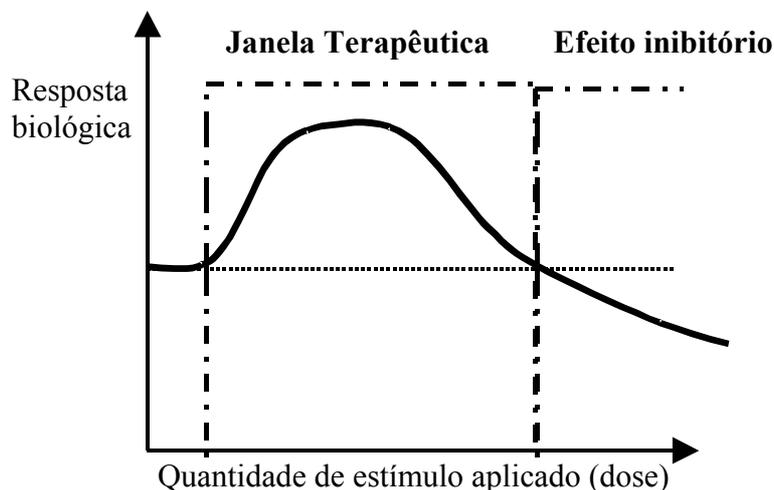


Figura 1.1 - Esquema da Lei de Arndt-Schultz representando o comportamento dose-resposta à irradiação por Laser. Fonte: AMARAL: *Tese de doutorado em Ciências fisiológicas*. São Carlos, 2004. 120f.

Karu (1989), sugere que a eficácia da radiação laser esta grandemente relacionada com uma adequada dosagem, aplicada de modo regular e gradual, de maneira que doses baixas ou altas podem não produzir efeitos ou gerar prejuízos, respectivamente.

Karu (1987); Yu *et al.* (1997), relatam que baixas doses regulam ou aceleram o transporte de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria, enquanto doses elevadas ocasionam efeitos adversos nos transportadores de elétrons (componentes da cadeia respiratória) os quais são importantes fotoceptores da radiação laser, também denominado de cromóforos, e fazem parte de uma estrutura chave da célula com capacidade para regular o metabolismo.

O tipo de feixe depende do material (fonte) e da configuração do sistema de produção da radiação laser, podendo ser pulsado ou contínuo (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996; LOW; REED, 2001; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004). Quanto à frequência de tratamento ideal, este parâmetro ainda não se encontra determinado na literatura científica, de modo que existem relatos de aplicações variando desde uma frequência diária até aplicações a cada dois dias ou duas vezes por semana (KARU, 1989; LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993).

MECANISMOS DE INTERAÇÃO DO LASER COM OS TECIDOS BIOLÓGICOS

A interação entre radiação eletromagnética na forma de laser e sistemas biológicos constitui-se em um dos mais interessantes problemas na bioenergética (QUARTO *et al.*, 1988). O mecanismo de conversão fotoquímica da terapia por luz não é privativo do laser, sendo uma propriedade de qualquer fonte de luz com comprimento de onda específico. O laser é apenas uma fonte de radiação eletromagnética conveniente que apresenta algumas vantagens práticas para irradiar o interior dos tecidos como, por exemplo, a facilidade no uso, a segurança do ponto de vista elétrico, a forte monocromaticidade e elevada densidade de potência. Entretanto, o mecanismo primário de ação dessa modalidade terapêutica sobre biomoléculas fotorreceptoras ainda não tem sido completamente estabelecido (KARU, 1999).

Apesar de permanecerem obscuros os mecanismos de ação do laser, acredita-se que esse tipo de radiação possui a capacidade de alterar o metabolismo celular, ou seja, estimular ou inibir atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas, na ausência de aquecimento tecidual significativo, fenômeno que se denomina de biomodulação o qual acontece quando da absorção, por parte de biomoléculas, dos fótons aportados pelo feixe (BASFOR, 1989; BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996; MORIMOTO *et al.*, 1994; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004).

A característica do efeito biomodulatório atribuído ao laser de baixa intensidade ao interagir com os tecidos biológicos, é referida como sendo dependente do comprimento de onda, densidade de potência, dose, frequência de tratamento, do tipo de tecido e de lesão, bem como, do espectro específico de absorção dos cromóforos (BECKERMAN *et al.*, 1992; DE BIE *et al.*, 1998; KARU, 1987; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

Várias teorias foram postuladas na tentativa de explicar o efeito da biomodulação do laser sobre as atividades celulares (SCHAFFER *et al.*, 1997). Dentre elas, destaca-se a fotoquímica que é a mais estudada e oferece uma explicação para a sensibilidade das células à luz laser. Esta teoria diz que a energia eletromagnética estimula fotorreceptores, os quais necessariamente fazem parte de vias bioquímicas celulares, podendo regular o metabolismo, como por exemplo, componentes da cadeia respiratória (NADH desidrogenase e citocromo C oxidase), que responderão a uma faixa de luz específica, após atingir um estado de excitação eletrônica (mudança no potencial redox), realizando assim, a conversão da energia eletromagnética em bioquímica (BECKERMAN *et al.*, 1992; KARU, 1998, 1999; ORTIZ *et al.*, 2001).

Wilden e Karthein (1998), relatam que os componentes da cadeia respiratória funcionam como uma espécie de “antenas ressonadoras” que respondem à radiação luminosa

de comprimentos de onda específicos, no sentido de aumentar o fluxo de elétrons, e conseqüentemente vitalizar a célula no aumento do metabolismo energético (Figura 1.2).

Estes fotorreceptores presentes na membrana mitocondrial absorvem luz no intervalo espectral do infravermelho próximo, bem como, na região do visível quando se encontram em seu estado redox intermediário, ou seja, nem totalmente reduzido ou nem oxidado, de modo que a excitação eletrônica desses componentes numa determinada seqüência pode influenciar a transferência de elétrons e ocasionar uma resposta biológica final (BAXTER, 1997; KARU, 1999, 2000; MORIMOTO *et al.*, 1994; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

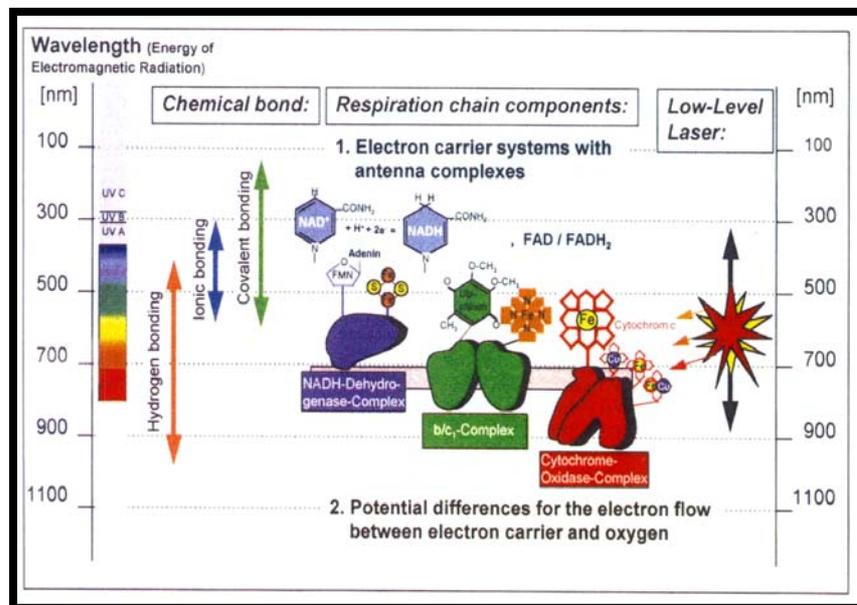


Figura 1.2 - Componentes da cadeia respiratória com suas respectivas estruturas químicas semelhantes a “sistemas de antenas” e a sua interação com a radiação eletromagnética laser com seus comprimentos de onda. Fonte: WILDEN; KARTHEIN: **Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, n. 3, 1998.

Baxter (1997) e Rochkind *et al.* (1989), sugerem que o laser de baixa intensidade gera efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos, não só na área de difusão óptica, mas também, por meio de mediadores metabólicos, nas regiões circundantes ocasionando manifestações sistêmicas. Uma possível explicação para esse efeito é o fato do tecido submetido ao laser produzir substâncias que após a irradiação vão circular nos vasos sanguíneos e no sistema linfático.

EFEITOS DO LASER SOBRE A MITOCÔNDRIA

Karu (1998); Manteifel, Bakeeva e Karu (1997); Salet, Passarela e Quagliariello (1987); Yu *et al.* (1997) sugerem que, uma vez absorvida a luz, os eventos primários fotoquímicos e fotofísicos acontecem na mitocôndria. Dentre os prováveis mecanismos primários físicos e/ou químicos da interação do laser com os fotoceptores da mitocôndria, destacam-se: 1. a mudança nas propriedades redox dos carreadores de energia com a conseqüente aceleração no transporte de elétrons na cadeia respiratória (KARU, 1998, 1999, 2000; WILDEN; KARTHEIN, 1998; YU *et al.*, 1997); 2. o aumento transitório local na temperatura dos cromóforos, ocasionando mudanças estruturais (conformacional) e na atividade bioquímica (reações secundárias), tais como a ativação ou inibição de enzimas, que favoreceria aos efeitos fotobiológicos (KARU *et al.*, 1994; KARU, 1999); 3. geração de espécies reativo de oxigênio - O_2^- (superóxido) em decorrência da auto-oxidação de um elétron, cuja produção é dependente do estado metabólico da mitocôndria. Essa organela, por sua vez, pode ter um mecanismo de reabsorção de O_2^- e por conseqüência, servir como fonte de elétrons para a fosforilação oxidativa de ADP sob condições fisiológicas (MAILER, 1990); 4. geração de oxigênio molecular (O_2) pela ativação do fluxo de elétrons na cadeia respiratória (FRIEDMAN; LUBART; LAULICHT, 1991; KARU, 1999, 2000; ORTIZ *et al.*, 2001).

Um outro mecanismo postula que mudanças nas propriedades químicas e físicas das membranas mitocondriais (cristas mitocondriais) induzidas pelo laser, resultam em fusão preferencial das membranas de mitocôndrias que estão localizadas uma ao lado das outras, constituindo assim uma mitocôndria gigante (MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997; BAKEEVA *et al.*, 1993), a qual é capaz de proporcionar altos níveis de respiração e energia de reposição, ao passo que numa mitocôndria pequena a transferência de energia acumulada e a diferença nos potenciais eletroquímicos dos prótons são menos eficientes (CAMPO; BOWMAN; TEDESCHI, 1984).

Greco *et al.* (1991), observaram a formação de mitocôndrias atípicas, bem como, o aumento na atividade enzimática, após a irradiação com laser He-Ne sobre mitocôndrias isoladas de fígado de ratos, sugerindo, assim, que algum mecanismo pode desencadear a biogênese mitocondrial a partir da irradiação por laser.

Assim, certamente existe mais de uma reação envolvida no mecanismo primário do efeito do laser de baixa intensidade sobre os componentes mitocondriais, sendo estas reações responsáveis por um certo efeito do laser sobre os tecidos. Entretanto, de acordo com Morimoto *et al.*, (1994); Yu *et al.* (1997), os efeitos do laser sobre as mitocôndrias são reversíveis, durando, pois, um período curto de tempo.

Karu (1987, 1999, 2000); Ortiz *et al.* (2001), sugerem que as mudanças primárias físicas e/ou químicas induzidas pela luz nas moléculas fotoceptoras são seguidas por uma cascata de reações bioquímicas na célula que não necessitam de ativação luminosa, constituindo assim, uma transdução do foto-sinal e uma amplificação em cadeia. Estas reações bioquímicas que acontecem após a ocorrência dos mecanismos primários conduzirão para um macro efeito fotobiológico, sendo denominadas de reações secundárias. Dentre os efeitos secundários da irradiação laser destaca-se a resposta em curto prazo da fotoestimulação da taxa respiratória e o aumento da síntese de ATP. Acredita-se que a radiação laser exerce um estímulo na produção de ATP no interior das células, efeito que se produz quando se tem alteração estrutural como o aumento proporcional das mitocôndrias (BAKEEVA *et al.*, 1993; MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997), alterações químicas como maior concentração e/ou atividade de componentes envolvidos no metabolismo energético, como por exemplo, o NADH desidrogenase (KARU, 1987; PASSARELA *et al.*, 1984) e o citocromo C oxidase (KARU, 1987; MORIMOTO *et al.*, 1994; PASTORE *et al.*, 1994, 1996; QUARTO *et al.*, 1988), e aumento no gradiente eletroquímico de prótons (PASSARELA *et al.*, 1984; PASSARELA *et al.*, 1988). Os possíveis mecanismos primários

da interação laser-biomolécula e os respectivos efeitos secundários em curto prazo estão ilustrados na Figura 1.3.

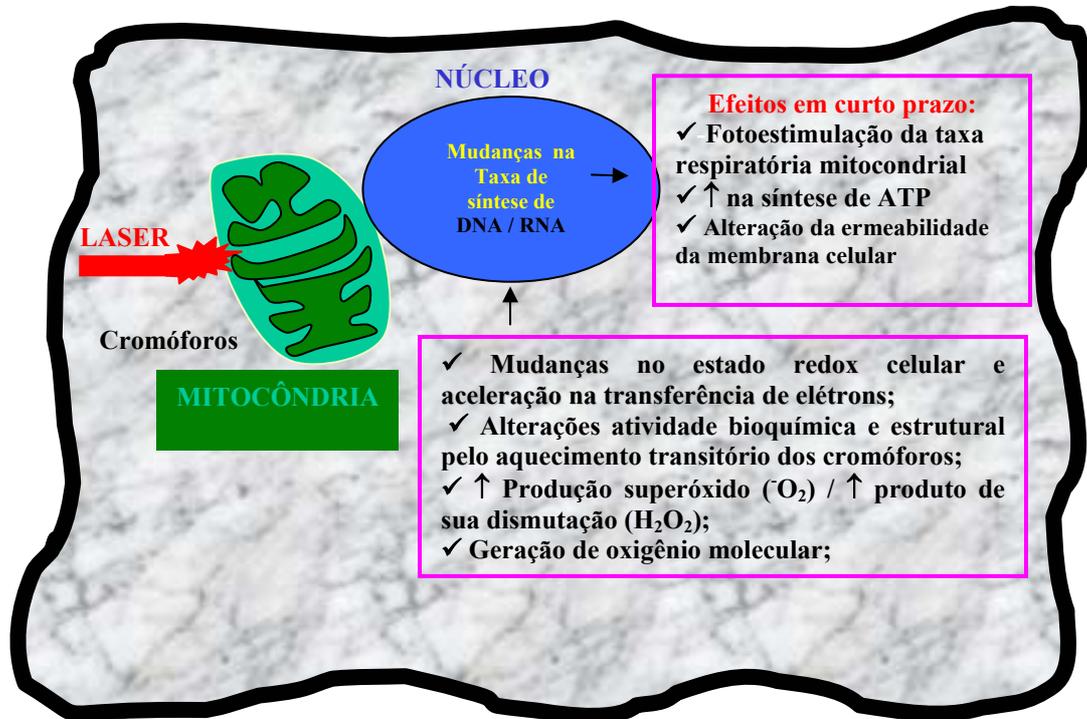


Figura 1.3 - Representação da célula e seus cromóforos, em destaque a mitocôndria, com os prováveis mecanismos de ação primária e efeitos em curto prazo do laser

Tomando por base os efeitos do laser sobre o metabolismo energético, via ativação mitocondrial, Molinari e Santos (2001), investigaram adaptações metabólicas relativas à concentração de lactato sérico ao treinamento aeróbio em ratos submetidos a ação do laser infravermelho (830 nm), obtendo como resultado uma redução significativa na quantidade de lactato plasmático no grupo fotoestimulado por laser. Esses autores sugeriram, pois, que as possíveis alterações químicas e/ou físicas dos componentes mitocondriais proporcionadas pelo laser podem refletir não só numa menor produção de lactato (como subproduto da via anaeróbia), mas também, favorecer sua metabolização pela célula.

Nessa mesma linha de pesquisa, Halsberghe (2003), verificou, por meio de análises de cinética enzimática, um aumento em 72% no metabolismo aeróbio do músculo sóleo,

imediatamente após treinamento aeróbio em ratos submetidos à irradiação laser na faixa do infravermelho (780 nm).

Assim, verifica-se a possibilidade do laser de baixa intensidade influenciar funções fisiológicas, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*, mediante ação sobre estruturas inerentes ao metabolismo celular.

1.3.2 – Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas presentes em todas as células eucarióticas, sendo essenciais para o metabolismo energético devido sua função em converter energia de nutrientes alimentares em uma forma biologicamente utilizável pelo processo denominado de fosforilação oxidativa (ALBERTS *et al.*, 1997; POWERS; HOWLEY, 2000). Isso é possível, pois essas estruturas contêm, em sua membrana interna, todo um complexo enzimático responsável pelo processo de transporte de elétrons, o qual libera energia que é armazenada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons, sendo utilizada para produzir a maior parte do ATP celular (ALBERTS *et al.*, 1997; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

Segundo Alberts *et al.* (1997), as mitocôndrias são originadas pela divisão de uma já existente, processo denominado de bipartição, que é semelhante ao de células procarióticas de vida livre como as bactérias. Além disso, essas organelas citoplasmáticas não só se dividem como também se fundem uma com as outras, cujo número por célula pode ser regulado de acordo com a necessidade do tecido, de modo que um grande número de mitocôndrias tende a ser observado em um músculo esquelético que é estimulado a se contrair por um período prolongado de tempo. Esta adaptação é denominada de biogênese mitocondrial (HOOD, 2001).

As mitocôndrias possuem também seu próprio DNA, um filamento circular e, portanto apresentam capacidade de síntese protéica. Seu número em vários tecidos reflete a função fisiológica do tecido e determina sua capacidade de realizar funções metabólicas aeróbias (ALBERTS *et al.*, 1997; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Wilmore e Costtil (2001), sugerem que a capacidade de utilizar oxigênio e produzir ATP através da oxidação depende não só da quantidade, mas também do tamanho e da eficiência das mitocôndrias presentes no músculo.

Kiberstis (1999), sugere que a mitocôndria desempenha, ainda, um papel central na regulação da morte celular programada (apoptose) através da interrupção do transporte de elétrons e conseqüentemente do metabolismo energético e pela ativação de proteínas que alteram a afinidade da célula por elétrons, ou seja, o seu potencial redox.

1.3.3 – Fisiologia do exercício

A fisiologia do exercício se ocupa do estudo das adaptações fisiológicas aos estímulos agudo e crônico do exercício, atividade física e/ou treinamento físico, de modo a contribuir para o entendimento de como a energia que é obtida pelo organismo, a partir dos alimentos que são consumidos, permite que ações musculares realizem o movimento (WILMORE; COSTILL, 2001). O estudo de tais adaptações fisiológicas torna-se importante, pois nos permite entender melhor as modificações da performance muscular do indivíduo mediante um estímulo de treinamento.

1.3.3.1 – Metabolismo do exercício e bioenergética

O exercício representa um grande desafio às vias bioenergéticas dos músculos em atividade, tendo em vista a grande demanda de energia por parte desses durante o exercício. Nesse sentido, o organismo dispõe de sistemas metabólicos responsáveis pela produção e/ou ressíntese de moléculas altamente energéticas como a adenosina trifosfato (ATP) no interior das células que operam com uma considerável sobreposição para suprir a energia necessária do exercício (CONLEY; KEMPER; CROWTHER, 2001; FOSS; KETEVIAN, 2000; POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

Esse processo metabólico capaz de converter nutrientes alimentares (carboidratos, gorduras e proteínas) numa forma de energia biologicamente utilizável é denominado de bioenergética, cuja transferência de energia no corpo ocorre por meio da liberação da energia contida em ligações químicas de várias moléculas (POWERS; HOWLEY, 2000; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

Os carboidratos e as gorduras são as principais fontes de energia na atividade de um indivíduo saudável que consome uma dieta balanceada, sendo que as proteínas possuem um pequeno papel como substrato energético durante o exercício (POWERS; HOWLEY, 2000). No entanto, o rendimento energético obtido com esses diferentes combustíveis, bem como a proporção de cada combustível utilizado como fonte de energia depende, de vários fatores, dentre eles: o tecido, a dieta, a intensidade e a duração do exercício e o estado hormonal e de treinamento do organismo (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; ZONDERLAND *et al.*, 1999).

No que se refere à duração e intensidade do exercício e seleção do substrato energético utilizado, é referido que durante o exercício prolongado de baixa intensidade, ou seja, maior que trinta minutos e menor que 30% do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$),

respectivamente, as gorduras são os substratos predominantes (ZONDERLAND *et al.*, 1999). Este fato tem sido atribuído a uma ativação das lipases (enzimas responsáveis pela degradação das gorduras) por parte de hormônios sanguíneos como a adrenalina e o glucagon que, por sua vez, produzem um aumento nos níveis sanguíneos e musculares de ácidos graxos livres (AGL) ativando o metabolismo das gorduras (POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001). Por outro lado, a medida que a intensidade do exercício aumenta, ocorre um aumento progressivo do metabolismo dos carboidratos e uma diminuição concomitante do metabolismo das gorduras. Dentre os fatores que contribuem para este fato, destacam-se: 1. o recrutamento das fibras de contração rápida e 2. o aumento do nível sanguíneo de adrenalina. Referente ao item 1, quando ocorre um aumento na intensidade do exercício, mais fibras musculares rápidas são recrutadas, as quais estão mais bem equipadas para metabolizar carboidratos do que gorduras, tendo em vista o grande número de enzimas glicolíticas em detrimento da baixa quantidade de enzimas oxidativas que estas fibras apresentam, ou seja, são fibras fisiologicamente especializadas para atividades de alta intensidade e curta duração. Relativo ao item 2, tem sido sugerido que o nível de adrenalina no sangue aumenta, ativando o metabolismo dos carboidratos (aumento da glicólise/glicogenólise) e a produção de lactato, de maneira que este aumento de lactato diminui o metabolismo das gorduras para a produção de energia (POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

Os mecanismos utilizados pelas células para gerar ATP, a partir da metabolização dos substratos energéticos, visando suprir suas funções e permitir que ações musculares ocorram, podem ser classificados em anaeróbio (quando não envolve a utilização de O₂) e em aeróbio (quando utiliza o O₂). Assim tem-se:

- Via anaeróbia:

1. Sistema ATP-CP: formação de ATP pela degradação da creatina fosfato (CP);

2. Sistema glicolítico: formação de ATP por meio da degradação da glicose ou do glicogênio.

- Via aeróbia:

1. Sistema oxidativo: formação oxidativa de ATP.

O sistema ATP-CP (ou sistema fosfagênico) é o mecanismo mais simples e mais rápido de geração de ATP. Inicia-se a partir da depleção do ATP armazenado no músculo que dura em torno de 3-4 segundos. Em seguida, ocorre a doação de um grupo fosfato da ligação energética da CP para o ADP, disponibilizando ATP (energia) para a contração muscular no início do exercício, esgotando-se em no máximo 15 segundos. Esta reação é catalisada pela enzima creatina quinase e tem como principal função manter um suprimento de ATP relativamente constante. No entanto, a quantidade total de ATP que pode ser formada por essa reação é limitada, de modo que a ressíntese da CP exige ATP e ocorre somente durante a recuperação do exercício. O sistema glicolítico (ou glicólise) também é capaz de produzir ATP rapidamente e envolve a degradação da glicose, numa seqüência de 10 reações enzimáticas, para formar duas moléculas de ácido pirúvico, com rendimento de duas moléculas de ATP no sarcoplasma da célula muscular. O sistema oxidativo consiste na produção de ATP com a utilização de O₂ que ocorre no interior das mitocôndrias e envolve a interação de dois processos metabólicos: 1. o ciclo de Krebs ou do ácido tricarboxílico, cuja função principal é a remoção de íons hidrogênio (H⁺) e a energia associada a esses hidrogênios de vários substratos envolvidos no ciclo e 2. a fosforilação oxidativa, que consiste na formação de ATP na cadeia de transporte de elétrons ou cadeia respiratória. Os hidrogênios são removidos dos substratos nutricionais não só durante o ciclo de Krebs, mas também, durante a glicólise e são transportados por “moléculas transportadoras” (ou equivalentes de redução) como as coenzimas: nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e flavina adenina

dinucleotídeo (FAD⁺) para serem utilizados na geração de ATP em processos aeróbios. A importância dessa remoção reside no fato de que os hidrogênios, em virtude dos elétrons que eles possuem, contêm a energia potencial das moléculas dos alimentos. Entretanto, para que ocorra o transporte desses equivalentes de redução do citoplasma até a matriz mitocondrial são necessários mecanismos de “lançadeiras de substratos”, presentes na membrana mitocondrial interna, envolvendo a transferência recíproca de elementos oxidados e reduzidos das várias duplas de oxirredução. Assim, se existir oxigênio suficiente, os hidrogênios da NADH (forma reduzida da coenzima) podem ser “lançados” via sistema de lançadeiras (malato-aspartato e/ou α -glicerofosfato) para o interior das mitocôndrias das células, cujos elétrons uma vez transportados para a cadeia de transporte de elétrons, fluem numa ordem seqüencial das estruturas de menor para maior potencial de redução, presentes nessa cadeia, onde a molécula de O₂ é o acceptor final, liberando energia suficiente para refosforilar o ADP e formar conseqüentemente ATP (POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001). O mecanismo que tenta explicar a formação aeróbia de ATP é conhecido como hipótese quimiosmótica, a qual baseia-se no fato de que a energia liberada durante a passagem dos elétrons pela cadeia respiratória é utilizada para bombear prótons (H⁺) liberados a partir da NADH e FADH₂ do interior das mitocôndrias, por meio da membrana mitocondrial interna, para o espaço entre as membranas mitocondriais interna e externa, sendo armazenada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons cuja energia é em última instância utilizada para gerar ATP (ALBERTS *et al.*, 1997; DEVLIN, 1998; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Por outro lado, se o O₂ não estiver disponível para aceitar hidrogênios nas mitocôndrias, o ácido pirúvico pode aceitá-los para formar o ácido láctico, numa reação catalisada pela LDH (lactato desidrogenase) e recuperar a NAD⁺, ou seja, a forma oxidada da coenzima para que a glicólise possa continuar (POWERS; HOWLEY, 2000; SPRIET; HOWLETT; HEIGENHAUSER, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

1.3.3.2 - Limiar de anaerobiose e metabolismo do lactato

O Limiar de Anaerobiose (LA) identificado pela lactacidemia, também denominado limiar de lactato, consiste na carga de trabalho correspondente ao momento em que o ácido láctico sanguíneo aumenta sistematicamente durante o exercício de esforço progressivo, ou seja, consiste no ponto de inflexão da curva de lactato sanguíneo *versus* à carga de exercício (LANGFORT *et al.*, 1996; PILIS *et al.*, 1993; POWERS; HOWLEY, 2000; VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2002; WILMORE; COSTILL, 2001).

Historicamente, esse aumento no nível sanguíneo de ácido láctico tem sido considerado uma indicação de aumento do metabolismo anaeróbio dos músculos que estão se contraindo em relação ao metabolismo aeróbio, em razão da maior demanda de O₂ nas células musculares e conseqüentemente, dos baixos níveis de O₂ disponível (BROOKS, 1998; KATZ; SAHLIN, 1988; SPRIET; HOWLETT; HEIGENHAUSER, 2000; WASSERMAN, 1984). Entretanto, outros fatores podem estar envolvidos na determinação do acúmulo de ácido láctico no sangue, tendo destaque à aceleração da glicólise, o maior recrutamento de fibras de contração rápida e a redução na taxa de remoção do lactato, de modo que qualquer um ou uma combinação desses fatores pode fornecer uma explicação para o LA (POWERS e HOWLEY, 2000).

Howlett *et al.* (1998), sugerem que a produção de lactato pode ocorrer durante o exercício aeróbio intenso, em decorrência de uma lenta ativação das rotas metabólicas que fornecem substrato para a produção aeróbia de ATP, como por exemplo, a ativação da enzima piruvato desidrogenase (PDH) que catalisa a reação de conversão do piruvato a acetil-coenzima (acetil-CoA), um substrato do ciclo de Krebs.

O acúmulo de lactato no sangue e no músculo em decorrência da ativação da via metabólica anaeróbia normalmente está associado ao acúmulo de íons H⁺, quando a

capacidade do organismo para tamponá-los for superada, e conseqüentemente, há uma redução do pH, ocasionando, dessa forma, uma acidose metabólica. Este fenômeno pode alterar o processo de contração muscular no momento em que esses íons H^+ podem deslocar os íons Ca^{++} do interior da fibra muscular. Isso, por sua vez, interfere no acoplamento actina-miosina, ocasionando uma diminuição na performance de força do músculo (HATTA, 1990; LIEBER, 1992; WILMORE; COSTILL, 2001).

O limiar de lactato ocorre numa intensidade submáxima do exercício, normalmente entre 50 e 80% da carga máxima, cuja concentração de lactato sérico tem sido estimada entre 2 a 4mmol/L. No entanto, esse valor é inferido para cada indivíduo (PILIS *et al.*, 1993; WILMORE; COSTILL, 2001).

Powers e Howley (2000) sugerem que o LA pode variar em decorrência de fatores genéticos, nutricionais, hormonais, sexo, dentre outros, e segundo o tipo e a quantidade de treinamento que o indivíduo foi submetido, de tal forma que em indivíduos não treinados, o LA se dá em torno de 50-60% da carga máxima, que pode ser representada pelo consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx), enquanto que nos treinados ocorre em taxas de trabalho mais elevadas (65-80% da carga máxima), representando assim, uma maior capacidade aeróbia.

Assim, tem sido sugerido na literatura científica que o acúmulo de lactato no sangue é reduzido, para uma mesma carga de trabalho, após um período de treinamento de *endurance* tanto nos estudos em animais quanto em humanos, cujas explicações para tal benefício tem sido atribuídas ao aumento na capacidade oxidativa, a redução na produção de lactato e ao aumento na taxa de sua remoção (BROOKS, 1998; GLADDEN, 2000; McDERMOTT; BONEN, 1993; SPRIET; HOWLETT; HEIGENHAUSER, 2000). Especificamente, sobre a remoção de lactato, esta pode ocorrer, após um programa de treinamento, pela ocorrência de fatores como: 1. o aumento na distribuição do lactato por outros tecidos como (fígado, coração, músculo esquelético e rins); 2. aumento da gliconeogênese por parte do músculo

esquelético e dos hepatócitos; 3. utilização do lactato pela contração de fibras oxidativas; 4. eficiente transporte de lactato através da membrana sarcolemal (FAVIER *et al. apud* MCDERMOTT; BONEN, 1993; GLADDEN, 2000; POWERS; HOWLEY, 2000). Além disso, o exercício pode aumentar o transporte de lactato via ativação de proteínas da membrana sarcolemal (BROOKS, 1998), e da atividade enzimática (DOHM; KASPEREK; BAKARAT, 1985), de modo a contribuir no aumento do caminho gliconeogênico do lactato. Entretanto, de acordo com HATTA (1990), a remoção oxidativa do lactato após o exercício ainda é o maior caminho de remoção desse metabólito.

Hollosszy e Coyle (1984), sugerem que a principal consequência metabólica do treinamento aeróbio é a redução da velocidade de utilização do glicogênio muscular e aumento no uso dos AGL como substrato energético, tendo como resultado final uma menor produção de lactato durante o exercício numa determinada velocidade.

Outros autores (DONOVAN; BROOKS *apud* BROOKS, 1998; GLADDEN, 2000; SPRIET; HOWLETT; HEIGENHAUSER, 2000; STANLEY *et al. apud* BROOKS, 1998; WASSERMAN, 1984), sugerem que baixo nível de lactato sanguíneo após treinamento de endurance pode ser reflexo não só da maior capacidade de sua utilização, mas também, devido à alta densidade mitocondrial e otimização da via oxidativa, com consequente oferta de O₂ para ser utilizado na produção de ATP.

Assim, o lactato que por um certo tempo foi considerado um produto inútil do metabolismo glicolítico, verifica-se, através de recentes evidências, que este metabólito pode ter um papel benéfico durante o exercício, servindo como substrato tanto para a oxidação pelos músculos esqueléticos e coração, mecanismo que responde por cerca de 70-75% de sua distribuição, quanto para a formação de glicose através da gliconeogênese (HATTA, 1990; POWERS; HOWLEY, 2000), com este processo contribuindo em 25-30% para a produção de glicose hepática tanto em humanos quanto em animais de experimentação (BROOKS, 1998).

Outro mecanismo sugerido para a metabolização do lactato consiste no consumo e oxidação do lactato em grande quantidade pelas mitocôndrias, sobretudo, do músculo esquelético, coração e fígado, dada a presença de proteínas de membrana transportadora de lactato, bem como, isoformas mitocondriais de enzimas como a mLDH (BROOKS, 1998).

Bonen e Homonko (1994), sugerem um modelo no qual fibras de contração rápida (tipo IIb) produzem lactato que é oxidado, subseqüentemente, por fibras vermelhas (tipos I e IIa), tendo em vista que estas duas últimas são metabolicamente adaptadas a oxidação do lactato e contêm maior capacidade para seu transporte sarcolêmico quando comparadas as fibras glicolíticas (BROOKS, 1998; GLADDEN, 2000).

O LA tem importantes implicações práticas como na predição da performance no esporte, bem como, no planejamento da intensidade de treinamento, de modo que vem se tornando popular na avaliação da efetividade do treinamento em atletas, tendo em vista à facilidade e a rapidez na obtenção e análise das amostras sanguíneas, quando avaliado pela lactacidemia. No entanto, esse método de avaliação do LA, apesar de sua importância na prescrição e controle do treinamento, por ser invasivo, nem sempre é utilizado em rotina de pesquisas laboratoriais, sobretudo nos estudos em humanos. (LANGFORT *et al.*, 1996; PILIS *et al.*, 1993; POWERS; HOWLEY, 2000; VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2002; WILMORE; COSTILL, 2001).

Pilis *et al.* (1993), Voltarelli, Gobatto e Mello (2002), têm demonstrado que alterações no lactato sanguíneo em ratos ocorrem de forma semelhante às em humanos. Entretanto, os estudos em animais de experimentação ainda são escassos, tornando-se, pois, importante essa análise como forma de contribuir na busca das evidências para determinar o mecanismo (ou mecanismos) fisiológico(s) que alteram a concentração sanguínea de lactato durante o exercício progressivo.

1.3.3.3 – Adaptações metabólicas ao treinamento aeróbio

O treinamento aeróbio ou de *endurance* consiste na prática de exercícios de baixa-moderada intensidade e longa duração no qual fibras musculares são submetidas a sobrecargas repetitivas e progressivas por período prolongado de tempo, demandando assim o metabolismo oxidativo para sua execução. Este tipo de treinamento promove uma série de adaptações fisiológicas no organismo que podem ser descritas em relação às alterações sistêmicas e musculares, as quais estão envolvidas com o aumento da capacidade do músculo em gerar ATP e utilizar a gordura como substrato energético (BLAIR *et al.*, 1994; FOSS; KTEYIAN, 2000; POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

As alterações mais imediatas perceptíveis do treinamento aeróbio envolvem o aumento da capacidade de realizar o exercício submáximo prolongado e o aumento da capacidade aeróbia máxima do indivíduo, de modo que à medida que esta aptidão aumenta, uma atividade classificada como anaeróbia pode tornar-se aeróbia, do ponto de vista da demanda metabólica ao organismo (MCARDLE; KATCH; KATCH, 1998; WILMORE; COSTILL, 2001).

Considerando as adaptações musculares tem sido documentado que o uso repetido das fibras musculares estimula alterações estruturais e funcionais, as quais podem ocorrer nas seguintes estruturas desse tecido: 1. no tipo de fibra muscular; 2. no suprimento capilar; 3. no conteúdo de mioglobina; 4. no conteúdo e função mitocondrial; 5. nas enzimas oxidativas

No que se refere ao tipo de fibra muscular, há evidências de que o treinamento aeróbio pode fazer com que fibras com características mais glicolíticas (tipo IIb) se transformem em outras com propriedades mais oxidativas (tipo IIa e/ou tipo I) (FOSS; KETAYIAN, 2000; LIEBER, 1992; WILMORE; COSTILL, 2001). Com relação ao suprimento capilar, o treinamento pode aumentar a quantidade de capilares no tecido muscular, o que promoverá

um aumento na perfusão sanguínea através do músculo e, conseqüentemente contribuirá para a manutenção de um ambiente adequado para a produção aeróbia de energia e para as contrações musculares repetidas (MCARDLE; KATCH; KATCH, 1998; WILMORE; COSTILL, 2001). Em se tratando do conteúdo muscular de mioglobina, este pode aumentar em 75 a 80%, melhorando por sua vez o fornecimento de O₂ para as mitocôndrias (FOSS; KETEVIAN, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001). Quanto às adaptações sobre a mitocôndria, observa-se o aumento no seu número e tamanho (densidade mitocondrial), fornecendo um sistema oxidativo mais eficiente ao músculo para utilizar o O₂ e produzir energia, de modo que, quanto maior for o volume do treinamento aeróbio, maiores serão as adaptações (LEEK *et al.*, 2001; WILMORE; COSTILL, 2001). Por último, tem sido sugerido que a atividade contrátil muscular crônica promove um aumento na concentração e na atividade das enzimas do metabolismo aeróbio, com destaque para a citrato sintase. Esta adaptação pode reduzir a velocidade de utilização do glicogênio muscular, em detrimento da maior oxidação das gorduras, bem como, reduzir a produção de lactato durante o exercício numa determinada velocidade (BLAIR *et al.*, 1994; GLADDEN, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

Zonderland *et al.* (1999), sugerem que a capacidade do músculo oxidar mais os ácidos graxos provavelmente reflete não somente uma maior atividade enzimática, mas também a melhor disponibilidade do substrato que é favorecida pelo treinamento aeróbio.

Todas as adaptações musculares ocasionadas pelo treinamento de *endurance* são altamente específicas ao tipo de treinamento e favorecem a um aumento na capacidade oxidativa e a uma transição mais rápida entre o estado de repouso e o exercício (BERGERON *et al.*, 2001; POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

O treinamento aeróbio pode ainda ativar uma variedade de quinases que poderiam estar envolvidas na fosforilação de fatores de transcrição, com destaque para a proteína 5' –

AMP – ativada (AMPK) (HOOD, 2001). Esta proteína tem sido implicada como sendo chave para o metabolismo muscular, controlando o metabolismo de gorduras e carboidratos (WINDER; HARDIE, 1999), de modo que há evidências de que sua atividade aumenta no músculo de ratos sob treinamento em esteira (WINDER; HARDIE, 1996), bem como, em humanos (CHEN *et al.*, 2000), quando as proporções de ATP/AMP e do conteúdo de fosfocreatina (PCr) estão diminuídos, ou seja, quando há estresse energético (BERGERON *et al.*, 2001).

Winder *et al.* (2000), relatam que o aumento na ação da AMPK está associado com aumentos na atividade de enzimas oxidativas mitocondriais. Assim, esses dados sugerem que repetidas sessões de exercício podem gerar adaptações bioquímicas no músculo mediadas pela ativação da AMPK.

Por outro lado, Moraska *et al.* (2000), sugerem que o treinamento aeróbio, por exemplo, em esteira, pode também promover mudanças negativas, tendo em vista que esse tipo de exercício pode ativar cronicamente respostas de estresse, as quais podem desencadear uma hipertrofia adrenal, uma involução tímica e uma ulceração gastrintestinal, envolvendo assim os sistemas endócrino, imune e neural que são estressores dependentes.

Hoffman-Goetz e Pederson (1994), consideram além das alterações físicas, as alterações de ordem psicológicas, como o estresse mental, as quais associadas àquelas influenciam todo e qualquer registro de variável fisiológica. Esses autores citam como exemplo animais que se exercitam em esteira, os quais quando são submetidos a estímulos adversos, agressivos, desencadeiam respostas de estresse mental.

1.3.4 – Enzimas e potenciais metabólicos

Enzimas consistem em proteínas especializadas que têm um importante papel na regulação das vias metabólicas das células, através de sua função catalisadora, atuando na aceleração de reações químicas, sem interferir nas propriedades termodinâmicas do sistema com o qual está interagindo (DEVLIN, 1998; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

As enzimas podem apresentar formas variadas que catalisam a mesma reação química, sendo denominadas de isozimas/isoformas, quando codificadas em genes/loci duplicados ou de alozimas/aloformas, quando codificadas em alelos diferentes no mesmo gene/locus. Estas geralmente diferem nas suas propriedades cinéticas ou reguladoras, no tipo de cofator que empregam ou na sua distribuição subcelular, podendo se apresentar citoplasmáticas, ligadas a membrana ou compartimentadas dentro de organelas, como as mitocondriais (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Há também moléculas orgânicas pequenas, freqüentemente derivadas de vitaminas, denominadas de coenzimas que se ligam às enzimas (apoenzimas) tornando-as biologicamente ativas no processo catalítico - holoenzimas. Estas estruturas, geralmente, apresentam uma afinidade pela enzima que é semelhante a do substrato, sendo, por conseqüência, consideradas como um segundo substrato (DEVLIN, 1998).

A atividade enzimática das fibras musculares fornece uma indicação relativa de seu potencial de oxidação, tendo em vista que um grande número de enzimas é necessário na oxidação de nutrientes energéticos. Nesse sentido, a regulação de uma ou mais enzimas de uma via metabólica provê o meio de controle da velocidade de uma determinada via energética. Uma vez que o metabolismo pode ser dividido em aeróbio ou anaeróbio, enzimas indicadoras de um ou outro tipo podem ser utilizadas para o entendimento do funcionamento de um organismo em uma dada condição ambiental ou para comparar as taxas metabólicas em

diferentes órgãos e tecidos em estudos fisiológicos e bioquímicos. A maioria das vias metabólicas possui uma enzima considerada “limitadora da velocidade”, a qual determina a velocidade da via metabólica particular envolvida. O sentido do fluxo de material, direto ou inverso, dependerá da concentração de substrato em relação a do produto e da constante de equilíbrio da reação (DEVLIN, 1998; POWERS; HOWLEY, 2000).

Enzimas indicadoras de potencial oxidativo como a citrato sintase (CS: E.C. 4.1.3.7) e a 1,3-hidroxiacil-CoA: NAD desidrogenase (HOAD: E.C. 1.1.1.36) e de potencial glicolítico como a hexoquinase (HK: E.C. 2.7.1.1), piruvato quinase (PK : E.C. 2.7.1.40 – principal indicador do potencial glicolítico) e lactato desidrogenase (LDH : E.C. 1.1.1.27 – enzima terminal da glicólise anaeróbia) têm sido utilizadas em estudos que visam elucidar aspectos adaptativos dos organismos aos diversos habitats e às flutuações das condições ambientais. Ao mesmo tempo, modelos empregando razões de atividades enzimáticas de rotas metabólicas aeróbias e anaeróbias são, freqüentemente, utilizados para distinguir músculos com diferentes características metabólicas. Atividade da CS, por ser a primeira de um conjunto de enzimas que fazem parte do metabolismo aeróbio do ciclo de Krebs, é considerada um marcador *standard* da capacidade oxidativa relativa de um tecido uma vez que é altamente correlacionada com a capacidade respiratória mitocondrial (HOLLOSZY; COYLE, 1984). A LDH não é considerada uma enzima limitante da velocidade da glicólise, mas sua atividade tem sido mostrada mais alta em tecidos com alta atividade glicolítica (NEWSHOLME; LEECH, 1988). Assim, em músculos com alta capacidade oxidativa ocorrerão baixas razões de atividade LDH/CS, enquanto que, em músculos com baixa capacidade oxidativa e alta glicolítica, essas serão altas. Entretanto, é importante ressaltar que embora a razão de atividade LDH/CS caracterize o tipo metabólico de músculo esquelético, ela não reflete o potencial metabólico absoluto (POWERS *et al.*, 1997). Por exemplo, a razão de atividade LDH/CS em músculo liso poderia sugerir características de um músculo esquelético aeróbio (vermelho), embora a totalidade das

atividades de suas enzimas oxidativas sejam consideravelmente mais baixas do que as do músculo esquelético vermelho (PETE; SPAMER, 1986). Em contraste, comparações das razões de atividade LDH/CS entre diferentes músculos esqueléticos fornece-nos uma indicação acurada do tipo metabólico desses.

1.3.4.1 – LDH

A LDH é uma enzima encontrada em muitos invertebrados e em todas as células dos vertebrados, aparecendo no tecido destes em, geralmente, cinco formas isozímicas/isofórmicas separáveis por eletroforese, todas contendo 4 cadeias polipeptídicas (tetrâmeros) e apresentando diferentes valores de velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e de constante de Michaelis-Menten (K_m). Essas cinco formas moleculares da LDH são resultantes da associação, ao acaso, de duas subunidades distintas: A (ou M) e B (ou H), as quais apresentam características estruturais e funcionais próprias e são codificadas por dois loci diferentes. Assim, o locus *LDH-A** codifica a subunidade A, e o *LDH-B** codifica a subunidade B, cuja associação permite a ocorrência de, pelo menos, duas isoformas homotetraméricas: a A_4 (M_4) ou LDH_5 , típica de músculo esquelético predominantemente anaeróbico, e B_4 (H_4) ou LDH_1 , típica de músculo cardíaco, tecido predominantemente aeróbico. Tanto nesses dois tecidos como em outros, aparecem também, em proporções distintas, dependendo da quantidade de subunidades de um tipo ou de outro, três isoformas heterotetraméricas, A_3B (LDH_4), A_2B_2 (LDH_3), AB_3 (LDH_2) (APELLA; MARKERT, 1961).

Almeida-Val *et al.* (1995), sugerem que a distribuição tissular de qualquer isozima reflete a expressão gênica, que pode ser regulada de acordo com as necessidades energéticas, disponibilidade de oxigênio e funções fisiológicas. Por exemplo, o aumento na expressão da

isozima da LDH-A nos tecidos considerados tipicamente aeróbios como o coração, pode ser detectado em animais expostos a hipóxia (HOCHACHKA; STOREY, 1975).

Nevo (1990), relata que o conhecimento sobre as isozimas e como elas se distribuem nos diversos tecidos são de grande valor, pois servem como evidências dos ajustes nos diferentes níveis: molecular, bioquímico, morfológico, fisiológico, evolutivo e comportamental.

A LDH ocupa importante posição no metabolismo celular, na via glicolítica, sendo responsável, quando o O_2 não se encontra disponível, pela reação de conversão do piruvato a lactato com oxidação simultânea da coenzima NADH a NAD^+ (forma oxidada). Na presença do O_2 , a LDH pode realizar a reação inversa, ou seja, de reoxidação do lactato a piruvato, o qual se transforma em acetil-CoA para formar ATP durante a fosforilação oxidativa. A forma oxidada da coenzima transportadora de elétrons (NAD^+) é essencial para possibilitar o prosseguimento da glicólise (POWERS; HOWLEY, 2000; DEVLIN, 1998; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A isoforma A_4 que só é inibida por altas concentrações de piruvato, é muito eficiente na conversão de baixas concentrações de piruvato em lactato no músculo esquelético, por isso é considerada uma *piruvato redutase*, atuando, pois, na manutenção do balanço redox durante períodos de escassez de O_2 (anaerobiose). Além disso, é encontrada em tecidos com alto potencial glicolítico anaeróbio. Por outro lado, a isozima B_4 tende a favorecer a oxidação rápida do lactato a piruvato no coração, tendo em vista que é, geralmente, considerada como *lactato oxidase*, e assim, “desvia” o substrato para o metabolismo aeróbio, evitando que o coração acumule lactato. Além disso, é inibida por altas concentrações de piruvato, e é encontrada em tecidos com metabolismo, predominantemente, aeróbios. Assim, uma relação B/A (atividade enzimática em baixa concentração de substrato / atividade enzimática em alta

concentração de substrato) pode fornecer uma idéia do tipo de subunidade predominante em cada tecido.

Segundo Powers e Howley (2000), a isoforma da LDH encontrada nas fibras de contração rápida possui uma menor afinidade ao ácido pirúvico (mais alto K_m), promovendo a formação de ácido láctico, enquanto que as fibras de contração lenta contêm uma isoforma da LDH que promove a conversão de ácido láctico em ácido pirúvico (maior afinidade, menor K_m). Assim, o ácido láctico pode se formar na fibra rápida durante o exercício simplesmente em razão do tipo de isoforma de LDH presente, independente, nesse caso particular, da quantidade de O_2 disponível.

Segundo Brooks (1998), há evidências da existência da isoforma LDH intra-mitocondrial (mLDH) que, preferivelmente, em relação à forma citosólica, é essencial no consumo e oxidação de lactato mitocondrial. Essa isoforma aparece principalmente no coração, podendo ocupar o espaço periplasmático ou a matriz mitocondrial.

1.3.4.2 – CS

A CS é uma enzima regulatória chave no caminho metabólico gerador de energia, cujo aumento em sua atividade tem sido implicado na facilitação do rendimento de energia via metabolismo aeróbio no ciclo de Krebs. Ela é uma das muitas enzimas que catalisam reações de condensação, sendo, pois, responsável pela catálise de condensação dos compostos oxaloacetato e acetil-CoA para formar um produto quimicamente mais complexo que esses precursores, o citrato (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; MORASKA *et al.*, 2000; SIU *et al.*, 2003).

Dada a sua importância no metabolismo aeróbio, essa enzima tem sido implicada como marcador para a avaliação da capacidade oxidativa após o exercício tanto em estudos

em animais (MORASKA *et al.*, 2000; SIU *et al.*, 2003), quanto em humano (LEEK *et al.*, 2001; TONKONOJI; HARRIS; SAHLIN, 1997), cujas evidências parecem sugerir que a capacidade oxidativa muscular e a atividade de enzimas mitocondriais como a CS são elevadas após um período de treinamento de *endurance*. No entanto, existem alguns resultados conflitantes, o que contribui para a realização de mais estudos nessa linha pesquisa.

Moraska *et al.* (2000), relatam que o aumento na atividade da CS é um indicativo de aumento da biogênese mitocondrial que proporcionará maior eficiência na produção de energia. Leek *et al.* (2001), sugerem que algumas variações observadas em estudos da CS, provavelmente não se devam nem ao tipo de programa de treinamento empregado, nem da amostra investigada, mas sim, ao efeito do exercício prévio ou efeito agudo como observado em seu estudo. Tonkonogi, Harris e Sahlin (1997), também observaram um aumento na atividade da CS em músculo esquelético, os quais relacionaram tal aumento ao efeito agudo (imediate) do exercício. Portanto, uma sessão aguda de exercício parece regular a atividade da CS no músculo esquelético, cujo efeito de aumento parece ocorrer 1 hora após o exercício permanecendo elevada até 24 horas e então retornando para a linha de base dentro de 72 horas. Entretanto, esse efeito agudo do exercício, por sua vez, pode ser influenciado pelo estágio de treinamento e pelo nível de CS.

Balogh *et al.* (2001), examinando alterações induzidas pelo exercício, em variáveis antioxidantes e bioquímicas no plasma de cavalos, verificaram um aumento na concentração de proteínas totais e na atividade de algumas enzimas, imediatamente após o exercício. Porém, todos os valores retornaram aos iniciais após 24 horas de repouso. Assim, torna-se importante verificar o tempo decorrido entre a última sessão de exercício e a coleta da amostra muscular (biópsia), pois isso consiste num ponto crucial quando se avalia a atividade enzimática (LEEK *et al.*, 2001). Esses autores relatam, ainda, que o mecanismo exato responsável pelo aumento na atividade da CS após o exercício é difícil de isolar, tendo em

vista que o exercício pode induzir uma vasta extensão de estímulos hormonais, fisiológicos e neurais que podem atuar em nível molecular e enzimático de forma isolada ou em combinação com outros parâmetros.

A atividade da CS investigada em músculo cardíaco parece não mostrar muitas alterações, tendo em vista que as adaptações da CS nesse tecido, não são ainda bem definidas (KAINULAINEN *et al.*, 1989; SIU *et al.*, 2003; ZONDERLAND *et al.*, 1999).

Siu *et al.* (2003), investigando o efeito do treinamento de *endurance* sobre a atividade da CS em músculo esquelético e cardíaco, não detectaram modificação significativa na atividade dessa, em músculo cardíaco. De acordo com esses autores, tal achado pode ter relação com o fato do músculo cardíaco possuir capacidade oxidativa prévia para suplementar o requerimento de energia durante o exercício.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

- Verificar possíveis adaptações bioquímicas/fisiológicas, relativas a atividade de duas enzimas, uma do ciclo de Krebs (CS) e outra glicolítica (LDH), e ao limiar anaeróbio (LA), em resposta ao exercício em esteira, em ratos submetidos à fotoestimulação por laser de baixa intensidade (780 nm) nos principais músculos participantes da marcha.

2.2 - Objetivos Específicos

- Quantificar as atividades da CS e LDH nos músculos sóleo, tibial anterior (TA) e cardíaco dos 4 grupos de animais e utilizá-las para a obtenção de:

* razões B/A (atividade da LDH em baixa concentração de substrato / atividade da LDH em alta concentração de substrato);

* razões LDH/CS que servem como indicadores metabólicos;

- Verificar, em eletroforese, através do método de Klebe (1975) a expressão dos loci duplicados da LDH através das intensidades relativas de suas subunidades, nos 3 tecidos de animais dos 4 grupos;

- Verificar e correlacionar possíveis modificações no LA e velocidade máxima da corrida, entre os dois grupos submetidos ao treinamento aeróbio.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Fizeram parte do experimento, inicialmente, 60 ratos machos jovens (30 dias) albinos, da variedade Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com peso inicial de $112 \pm 4,7\text{g}$. Os animais foram alojados em biotério próprio do Laboratório de Fisiologia do Exercício e acondicionados em gaiolas coletivas de polipropileno, divididos em grupos de cinco animais por caixa. Esses animais receberam como alimento sólido, ração peletizada da marca Pró-Biotério para roedores e água “*ad libitum*” (Figura 3.1). Durante o período de experimentação, esses animais permaneceram em sala com temperatura controlada, na faixa de $22^{\circ}\text{-}27^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo definido em 12hs de claro e 12hs de escuro.



Figura 3.1 - Gaiolas coletivas contendo cinco animais sob ração e água “*ad libitum*”

3.2 – Procedimentos

Os animais foram divididos em quatro grupos: (1) GRC e (2) GRL que permaneceram em repouso, sendo um deles GRL ($n = 10$) irradiado por laser de baixa intensidade e o outro, nosso controle GRC ($n = 10$), não. Os outros dois (3) GEC e (4) GEL foram submetidos a um

protocolo de treinamento aeróbio em esteira e a testes de esforços crescentes para a obtenção de amostras de sangue, sendo um destes GEL (n = 20) irradiado por laser e o outro, nosso controle GEC (n = 20), não. Entretanto, considerando a necessidade do sacrifício dos animais dos diferentes grupos experimentais para a coleta de amostras musculares para serem utilizadas durante a análise de cinética enzimática, bem como, devido ao número limitado de animais que a esteira utilizada no estudo comportava, esse trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira, foram utilizados 30 animais, de modo que foram coletados dados dos grupos (1) e (3) (não estimulados por laser). Após a realização dos procedimentos propostos, outros 30 animais foram utilizados durante a segunda etapa do estudo, na qual foram coletados dados dos outros dois grupos, (2) e (4) (submetidos a irradiação por laser).

O critério de distribuição dos grupos utilizado no estudo respeitou a seleção natural dos animais durante o período de adaptação a esteira, de tal forma que aqueles animais que não acompanharam o período de adaptação proposto foram automaticamente separados para compor os grupos (1) e (2) (em repouso) até se atingir o número amostral pré-determinado para cada um desses dois grupos (n=10).

Para todos os grupos (experimentais e controles) amostras de músculos sóleo, TA e cardíaco foram coletadas após o período de treinamento aeróbio para serem utilizadas nas análises qualitativas (eletroforese em gel de amido) e quantitativas (espectrofotometria) da atividade enzimática.

Os animais utilizados nas duas etapas do estudo apresentaram especificações semelhantes de peso e idade, foram submetidos às mesmas condições ambientais e de alimentação supracitadas e foram analisados no mesmo período sob os mesmos métodos, no que se refere à cinética enzimática. Além disso, o tempo decorrido entre o último teste de esforço crescente e a realização do sacrifício dos animais foi semelhante para ambas as etapas, assim como o tempo de duração da coleta das amostras musculares.

Após o período de distribuição dos animais em cada um dos grupos, aqueles que não acompanharam o protocolo de treinamento aeróbio proposto foram descartados do estudo. Além disso, também foram excluídos aqueles em que não foi possível identificar o LA pela análise da lactacidemia. Assim, dos 60 animais obtidos inicialmente no estudo, três foram excluídos do grupo 3 e dois do grupo 4 por não exibirem curva de LA, bem como, um animal foi descartado do grupo 2 por ter morrido, totalizando assim, 54 animais ao término do estudo distribuídos entre os 4 grupos, conforme previamente citado.

3.3 –Instrumentação

O treinamento aeróbio e os testes de esforços crescentes e intervalados foram realizados em uma esteira ergométrica para animais de pequeno porte, contendo três partes (Figura 3.2a), cada qual com 7 raias individuais. Isto permitiu que os animais se exercitassem simultaneamente e isoladamente (Figura 3.2b). Além disso, a esteira era acionada por um motor de corrente contínua de 24 Volts com controle de velocidade, o qual permitiu controlar e selecionar a velocidade pré-determinada em (m/min). A esteira era dotada, ainda, de um mecanismo que possibilitava o ajuste manual da inclinação, permitindo uma variação ascendente e descendente de até 20% (Figura 3.2c).

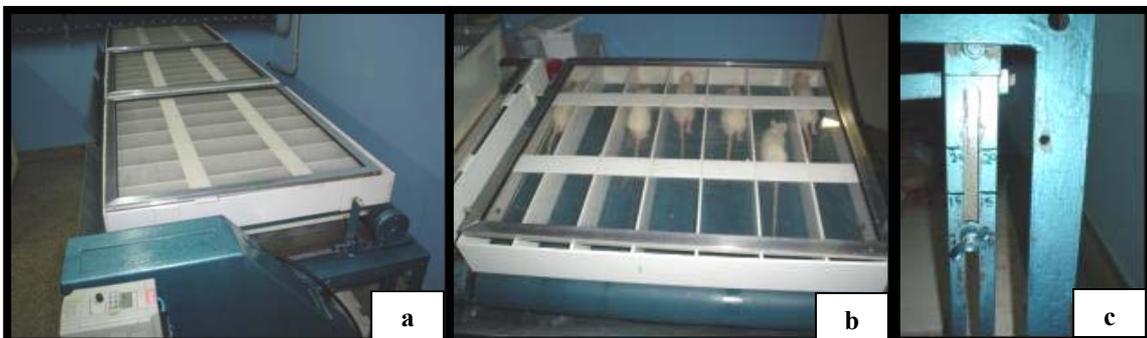


Figura 3.2 - Esteira ergométrica contendo 3 partes (a); separada por 7 raias individuais em cada parte (b); dotada de um sistema manual de inclinação de até 20% (c)

A irradiação por laser de baixa intensidade foi realizada através de um aparelho do tipo infravermelho (GaAlAs), da Classe IIIB-CEI-IEC 825-1, com comprimento de onda (λ) de 780 nm e potência programável (Figura 3.3), o qual foi previamente aferido conforme normas do fabricante.



Figura 3.3 - Aparelho de laser infravermelho (GaAlAs) com comprimento de onda de 780nm da Classe IIIB-CEI-IEC 825-1

Para a dosagem do lactato sanguíneo a fim de determinar o LA dos animais, foi utilizado um lactímetro, modelo: *YSI MODEL 1500 Sport Lactate Analyzer* (Figura 3.4), o qual era previamente calibrado segundo o padrão indicado pelo fabricante.



Figura 3.4 - Lactímetro *YSI MODEL 1500 Sport Lactate Analyzer*

Para a análise de cinética enzimática foi utilizado um espectrofotômetro HP UV-Vis G1107A Diode Array, com unidade ótica modelo 8452-A, controlada por computador tipo PC486, com processador matemático e interface HP-1B, monitor de vídeo e impressora tipo

Deskjet, software de cinética multicélula MS-DOS e controlador de temperatura tipo Peltier (Figura 3.5).



Figura 3.5 – Espectrofotômetro HP UV-Vis G1107A Diode Array, com unidade ótica modelo 8452-A com controlador de temperatura tipo Peltier

3.4 – Pré-treinamento (adaptação e condicionamento do animal à esteira)

Os dois grupos de animais que foram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio e aos testes de esforços crescentes e intervalados passaram, primeiramente, por um período de adaptação à esteira, de modo que os mesmos foram submetidos a esteira desligada durante vários minutos. Em seguida foram condicionados a andar/correr na esteira ergométrica durante seis dias consecutivos, inicialmente com velocidade muito baixa (6 m/min) com 0% de inclinação e tempo de 5 minutos, até atingirem, a partir da progressão da carga de trabalho (tempo de atividade e velocidade), um máximo de 10 minutos de esforço diário com velocidade de 17,5 (m/min) no 6º dia que era a velocidade mínima preconizada para o início do treinamento aeróbio. As sessões tanto de adaptação quanto do treinamento foram sempre no início do crepúsculo, período do dia em que os ratos naturalmente costumam entrar em sua mais alta atividade, por serem animais de hábito noturno, bem como a sala de treinamento permaneceu na penumbra, visando com isso obter uma melhor adaptação do animal à esteira, melhor desempenho no treinamento e minimizar possíveis respostas de estresse pelos sistemas responsivos a esse fenômeno orgânico, pois de acordo com Maestroni, Conti e Poerpaoli

(1986), à alteração no horário de atividade pode ocasionar alteração no ritmo biológico do animal e desencadear tais respostas adversas.

3.5 –Treinamento aeróbio

O protocolo de treinamento aeróbio foi realizado diariamente, de domingo a quinta-feira, durante cinco semanas. Este apresentava um aumento diário na carga de trabalho (dois minutos no tempo de treinamento e uma progressão variável na velocidade), até se atingir uma meta pré-determinada para o último dia de treinamento semanal (Anexo A). Esta graduação teve o intuito de possibilitar uma boa adaptação dos animais ao treinamento, preconizando assim um predomínio do treinamento aeróbio, conforme averiguado previamente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia do Exercício pertencente ao Departamento de Ciências fisiológicas da UFSCar sob a coordenação do Prof^o. Dr^o. Sérgio E. de Andrade Perez, bem como, sugerido por outros investigadores (MORASKA *et al.*, 2000). É válido salientar que sempre o início da corrida ocorria numa carga de trabalho menor (10% da velocidade e tempo pré-determinados para o dia) como forma de aquecimento, conforme preconizado por (SIU *et al.*, 2003). Durante o treinamento, os animais receberam estímulos “manuais” do tipo “toques leves” em suas caudas, através das polpas digitais dos examinadores, como forma de exigir o máximo do animal e garantir uma maior uniformidade de resposta do grupo amostral ao treinamento.

3.6 – Teste de esforço

O teste de esforço para avaliação do LA foi realizado uma vez por semana, no dia seguinte (sexta-feira) ao último dia de treinamento semanal, totalizando cinco avaliações,

sendo sábado o dia de descanso dos animais, conforme ilustrado no Anexo A. Esse teste de esforço foi do tipo em degraus descontínuos com velocidades crescentes, em esteira ergométrica. Antes do início do teste de esforço era retirada a primeira amostra (linha de base). Em seguida, os animais foram submetidos a intervalos de esforço físico, com duração de três minutos, seguidos de intervalos de dois minutos a cada bloco de exercício para a coleta de sangue.

A velocidade da esteira era aumentada em 4 m/min a cada intervalo de exercício, com inclinação constante de 10%, conforme teste realizado por Langfort *et al.*, 1996; Pilis *et al.*, 1993, cuja velocidade inicial foi de 13 m/min. Assim, as velocidades da esteira foram: 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 m/min, seguindo-se nessa ordem até o animal atingir a exaustão física.

3.7 – Coleta de amostras de sangue e dosagem de lactato sérico

Para a realização da coleta de sangue o animal foi imobilizado manualmente. Em seguida, foi realizado um pequeno “pique” na sua cauda para retirada de 25 µl de sangue diretamente em tubo capilar previamente calibrado e heparinizado. Depois, o sangue era transferido para um tubo de capacidade de 0,5 ml tipo “ependorff” contendo (50µl) de anticoagulante (fluoreto de sódio) (Figura 3.6). O material retirado foi mantido, durante o procedimento, refrigerado, sendo em seguida congelado em freezer até sua utilização na mensuração do lactato. Imediatamente após a coleta de cada amostra para cada animal, o ferimento do pique foi heparinizado, a fim de impedir a coagulação do sangue e evitar novos piques a cada coleta, o que traria estresse ao animal.

A dosagem de lactato sérico foi obtida através de um lactímetro, cujos valores reais foram determinados mediante multiplicação daqueles valores fornecidos pelo aparelho por

três, tendo em vista que o conteúdo dosado pelo instrumento para cada amostra foi de 25 μ l (1/3 do volume total existente no tubo “ependorff”).

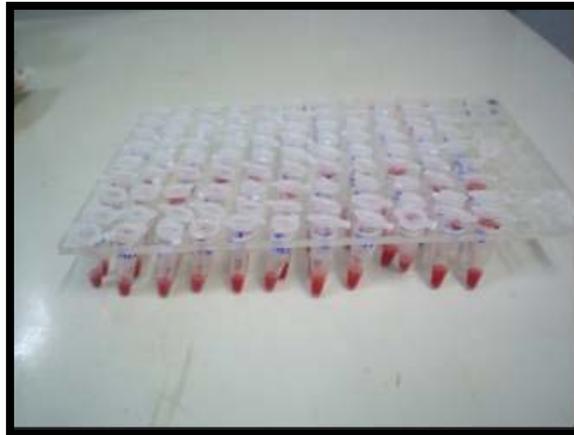


Figura 3.6 - Tubos “ependorff” contendo as amostras de sangue misturado com o fluoreto de sódio

3.8 – Irradiação por laser de baixa intensidade

O tratamento com laser infravermelho foi realizado diariamente, utilizando os seguintes parâmetros: (λ) de 780 η m, dose de 3,8 J/cm², potência de 15 mW, irradiância de 37,5 mW/cm² no modo contínuo, por 30 dias consecutivos, conforme utilizado por (HALSBERGHE, 2003). As aplicações da radiação laser no grupo submetido ao exercício (GEL) foram realizadas imediatamente após a corrida na esteira, visando aproveitar as condições de “estresse físico” e conseqüentemente, de alterações metabólicas do animal, tendo em vista a maior eficácia do laser nessas condições (KARU, 1987; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991). As aplicações foram em número de quatro em cada pata traseira dos animais, totalizando oito aplicações por animal/dia, sendo uma na região suprajacente do quadríceps, outra no TA, outra no sóleo, e outra na região do glúteo máximo, todas sobre a pele depilada, utilizando-se a técnica pontual (Figura 3.7a-c). Para realizar as aplicações do laser, o animal foi contido manualmente por um segundo examinador, objetivando favorecer o fácil acesso aos pontos de aplicação nos membros posteriores dos animais.

A escolha e a quantidade dos pontos de irradiação teve o propósito de estimular os principais músculos utilizados durante a marcha/corrída e obter possível resposta mensurável em proporções sistêmica, respectivamente (BAXTER, 1994).

Para demarcar os pontos de aplicação foram tomados como referência os locais depilados nos membros dos animais em conjunto com a determinação dos músculos por anatomia de superfície, sendo a depilação um meio de evitar e/ou minimizar a reflexão e a refração, e conseqüentemente, aumentar a efetividade da irradiação por laser (BAXTER, 1994).

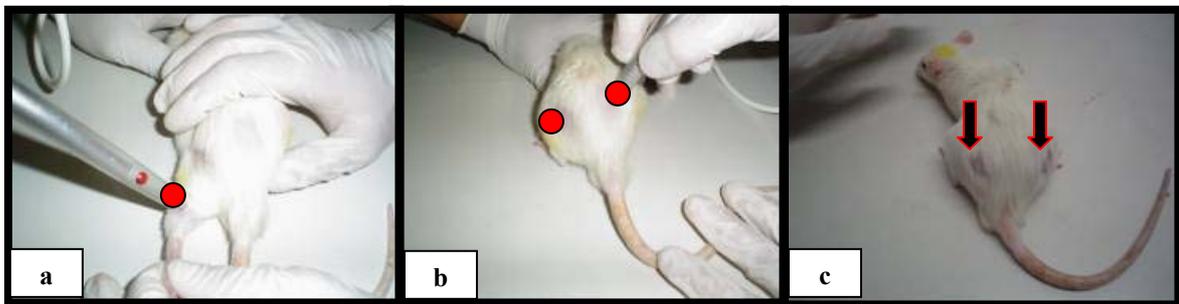


Figura 3.7 - Aplicação do laser sobre os músculos sóleo e glúteo, respectivamente, utilizando a técnica pontual, sob a estabilização do animal por um outro examinador (a e b); setas indicando os pontos do músculo glúteo D e E com a pele depilada (c). D = direito; E = esquerdo

3.9 – Enzimas

O sacrifício dos animais foi realizado dois dias após o término do último teste de esforço proposto no protocolo de treinamento (ver Anexo A) através do uso de éter em cuba anestésica visando a obtenção do material muscular. Esse intervalo de tempo até o sacrifício foi adotado como forma de garantir que eventuais modificações observadas entre os grupos investigados, no que se refere à cinética enzimática fossem decorrentes do tratamento proposto (irradiação por laser) e não a um possível efeito agudo da última sessão de treinamento, como sugerido por Leek *et al.*, (2001). Foi realizada a coleta de dois músculos da marcha de todos os animais: o sóleo, o qual é um músculo esquelético de contração lenta, predominantemente de fibras vermelhas, e assim de alta taxa oxidativa e baixa taxa glicolítica,

e o TA, que é um músculo esquelético de contração rápida, predominantemente de fibras brancas, e assim de baixa taxa oxidativa e alta taxa glicolítica. Esses foram utilizados para as análises de atividade enzimática visando identificar possíveis alterações metabólicas em músculos irradiados diretamente por laser.

Foi também realizada a coleta do músculo cardíaco com o objetivo de detectar possíveis alterações sistêmicas da irradiação por laser, tendo em vista que a região torácica não foi fotoestimulada.

Os músculos coletados foram seccionados em duas partes. Uma delas, abrangendo aproximadamente 33% da massa inicial, foi direcionada para a análise da cinética da CS, e a outra (aproximadamente 66%) destinada à cinética da LDH. Depois de pesados, esses fragmentos foram, então, imediatamente congelados por meio da imersão em nitrogênio líquido, durante o experimento, e posteriormente guardados em freezer a uma temperatura aproximada de (-80°C) até a análise.

3.9.1 - Preparação dos extratos de tecidos

Frações de cada músculo coletado bilateralmente (sóleo, TA e cardíaco) foram pesadas e homogeneizadas conjuntamente (*pool*) em tampão gelado, específico para cada cinética (ver abaixo) obedecendo a uma relação peso/volume de 1/4.

- LDH: 150 mM de IMIDAZOL (SIGMA), 1 mM de EDTA, 5 mM de DTT (Ditiotreitol – SIGMA), a 1% TRITON X-100, pH 7,4 a 25°C.
- CS: 20 mM de HEPES (SIGMA), 1 mM de EDTA (SIGMA), a 1% TRITON X-100 (SIGMA), pH 7,4 a 25°C.

Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B) a 27.000 g por 15 minutos, a uma temperatura de 4°C.

Após a centrifugação, os extratos contendo os *pools* de cada tecido foram utilizados para medida da atividade da LDH e CS e, em eletroforese em gel de amido, para detecção e quantificação das isoformas da LDH.

3.9.2 - Ensaio enzimático e medida de concentração protéica

Determinações espectrofotométricas da atividade enzimática foram feitas em volume final de 1,0 ml, a 25°C, sendo realizada triplicata de cada amostra (*pool*), utilizando técnicas revistas por Driedzic e Almeida-Val (1996). Todos os ensaios enzimáticos eram realizados no mesmo dia a fim de reduzir variações inter-ensaios. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, seguindo-se pela oxidação do NADH a 340nm, (coeficiente de extinção milimolar = 6,22) para a LDH. Em se tratando da CS, a reação foi monitorada seguindo-se a produção de ânion reduzido de DTNB a 412 nm (coeficiente de extinção milimolar = 13,6). Os resultados foram expressos em UI/mg de proteína, onde U representa unidade de atividade enzimática e é definida como a quantidade de enzima que converte 1 μmol de substrato ao produto por minuto ($\mu\text{moles de substrato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína), a 25°C. A dosagem protéica foi realizada segundo o método de Kalckar (1947) que consiste na titulação do triptofano, por métodos espectrofotométricos na região do ultra-violeta. Para tanto, foram feitas leituras de cada amostra em 280nm e 260nm, em cubetas de 1ml e calculadas as quantidades de proteína pela fórmula:

$$1,45 \text{ DO}_{280} - 0,74 \text{ DO}_{260} \cdot \text{diluição} = \text{mg de proteína/ml}$$

Foram utilizados os seguintes protocolos:

□ LDH: 1 mM e 10 mM de piruvato (SIGMA) - (omitido nos controles), 0,15 mM de NADH (SIGMA), 1 mM de KCN e 50 mM de Imidazol, pH 7,4.

□ CS: 0,5 mM de oxaloacetato (SIGMA) - (omitido nos controles), 0,4 mM de acetil-CoA (SIGMA), 0,25 mM de DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) – SIGMA) e 75 mM de Tris-HCl, pH 8,0.

Todas as análises de atividade enzimática da CS e LDH foram obtidas de médias das triplicatas entre os quatro grupos, estabelecidas pelos valores absolutos do *pool*.

O cálculo para determinação da atividade enzimática seguiu a equação descrita a seguir:

$$\mu\text{moles substrato} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ de proteína (tecido fresco)} \cdot \text{min}^{-1} = \frac{\text{fd (amostra)} \times \text{fd (cubeta)} \times \Delta \text{OD} / \text{min}}{\frac{6,22 \text{ ou } 13,6}{\text{mg de proteína}}}$$

onde:

fd = fator de diluição

$\Delta \text{OD} / \text{min}$ = variação na densidade óptica por minuto

6,22 = coeficiente de extinção molar da coenzima NADH - (LDH)

13,6 = coeficiente de extinção molar do DTNB - (CS)

3.9.3 - Eletroforese em gel de amido

Os extratos obtidos da centrifugação foram submetidos à eletroforese em gel de amido, sistema horizontal, segundo Smithies (1955). Na preparação dos géis, foi utilizado amido de milho obtido segundo Val *et al.* (1981). A solução tampão utilizada foi o Tris-Borato-EDTA alcalino (EBT), pH 8,6 conforme descrito por Boyer, Fainer e Wason-williams (1963) para a LDH.

A aplicação das amostras foi feita, inserindo-se pequenos retângulos de papel Whatman 3MM (1,0 x 0,5cm) no gel, em cortes transversal feitos previamente, a uma distância de 5cm da extremidade catódica. As eletroforeses corriam durante 14 horas a 4°C com uma voltagem de 4V/cm.

3.9.3.1 - Detecção das isoformas da LDH

Após eletroforese, as bandas com atividade enzimática foram reveladas através do método de coloração histoquímica, segundo Shaw e Prasad (1970).

3.9.3.2 - Quantificação das intensidades relativas das isozimas pelo Método de Klebe (1975)

As contribuições relativas de genes duplicados às atividades isofórmicas da LDH nos três tipos de músculos aqui analisados, foram obtidas pelo procedimento de diluições seriadas de Klebe (1975), que determina os pontos finais visuais de cada isoforma em cada tecido. Assim, com esse procedimento, utilizaram-se diluições seriadas pela metade de extratos dos três músculos (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128), as quais foram aplicadas, seqüencialmente, em eletroforese de gel de amido. Após a eletroforese, os géis foram corados, histoquimicamente, e as reações de coloração interrompidas, assim que aparecia no canal que continha a menor diluição empregada, a atividade enzimática de pelo menos uma banda. A última diluição na qual uma banda é visível denomina-se ponto final visual de cada homopolímero produzido por um gene duplicado. Assim, sendo um homopolímero detectado pela última vez na quinta diluição pela metade (1/32), após o outro homopolímero presente no tecido, dizemos que este tem uma atividade de, aproximadamente, 32 vezes a do outro, ou

seja, ocorre numa proporção aproximada de 32:1. Se somente uma banda polimérica é observada, pode-se interpretar tal resultado como a ausência de expressão de outros genes ou, a expressão desses num nível inferior ao limite de detecção pelos métodos histoquímicos utilizados. Como não é possível distinguir a alternativa correta, assumimos a segunda alternativa estabelecendo um limite inferior para os diferentes homopolímeros. Assim, quando somente uma banda homopolimérica é observada, sem detecção de heteropolímeros, considera-se que os outros homopolímeros não são detectáveis, porém estão presentes numa proporção de 1:256.

Nos casos onde somente um dos homopolímeros é detectado num tecido juntamente com o heteropolímero, dizemos que o segundo locus está ativo num nível muito baixo. Da relação das atividades do homopolímero em relação ao heteropolímero no procedimento das diluições seriadas de Klebe (1975), é possível se calcular as contribuições relativas dos tipos de subunidades e os níveis teóricos do segundo homopolímero indetectável.

Segundo Ferris e Whitt (1979), as proporções das intensidades relativas das isozimas refletem as proporções molares dos diferentes tipos de subunidades e, com isso, as expressões relativas de genes duplicados. Assim, as proporções molares das subunidades nos diferentes tecidos foram estimadas pela raiz quádrupla da proporção de atividade do homopolímero para a LDH, já que se trata de uma enzima tetramérica.

Todos esses procedimentos enzimáticos foram realizados no Laboratório de Evolução Molecular, pertencente ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (DGE/UFSCar), sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Luiza B. Schwantes.

3.10 – Tratamento de análise dos dados

Os dados referentes à atividade enzimática detectada em extratos de músculos sóleo, TA e cardíaco e ao LA dos animais foram submetidos ao teste estatístico de variância (ANOVA One-Way) e/ou KRUSKAL-WALLIS, conforme a normalidade ou não dos dados, respectivamente, permitindo a análise comparativa entre os grupos. Os testes *post-hoc* de TUKEY e de NEWMAN-KEULS, respectivamente, foram eleitos para a localização e caracterização das diferenças entre grupos específicos, considerando um nível de probabilidade de 5% ($P \leq 0,05$) como o limite de significância estatística. Foi utilizado ainda o teste de correlação de PEARSON para verificar a existência ou não de correlação entre os dados da velocidade máxima e velocidade no momento do LA. Como critério para determinação do LA de cada animal se utilizou a inspeção visual realizada por 5 examinadores tomando-se a moda como valor final.

4 – RESULTADOS

4.1 - Caracterização dos animais

4.1.1 - Corrida na esteira:

As metas semanais pré-determinadas no protocolo de treinamento aeróbio em esteira realizado pelos animais dos grupos 3 e 4 são apresentadas na Tabela 4.1. Todos os animais completaram o protocolo de treinamento proposto, exibindo, pois, boa adaptabilidade e performance aeróbia. Assim, os animais iniciaram o treinamento de corrida numa velocidade média de $17,5 \pm 4,14$ (m/min), percorrendo uma distância de $0,175 \pm 0,05$ (km) durante $10 \pm 0,03$ (minutos). Ao final das 5 semanas de treinamento, os animais atingiram uma velocidade média de $30,5 \pm 0,47$ (m/min), percorrendo uma distância de $1,906 \pm 0,13$ (km) durante $60 \pm 0,05$ (minutos). Esses parâmetros foram semelhantes para todos os animais, tiveram um caráter de aumento gradativo no decorrer das semanas e se mostraram inferiores ao LA dos animais, o que justifica e caracteriza um protocolo de treinamento predominantemente aeróbio como já esperado, tendo em vista a realização de estudos pilotos prévios e sua utilização por outros autores (HALSBERGHE, 2003).

Tabela 4.1 – Parâmetros (metas) pré-determinados do treinamento aeróbio realizado pelos animais dos grupos 3 e 4. Valores referentes à média e desvio-padrão

semanas n°	tempo (min)	distância (km)	vel. média (km/h)	vel. média (m/min)
início	$10 \pm 0,03$	$0,175 \pm 0,05$	$1,09 \pm 0,26$	$17,5 \pm 4,14$
1	$20 \pm 0,05$	$0,393 \pm 0,09$	$1,31 \pm 0,09$	$21,0 \pm 1,46$
2	$30 \pm 0,05$	$0,781 \pm 0,11$	$1,56 \pm 0,08$	$25,0 \pm 1,28$
3	$40 \pm 0,05$	$1,134 \pm 0,11$	$1,71 \pm 0,05$	$27,5 \pm 0,76$
4	$50 \pm 0,05$	$1,504 \pm 0,12$	$1,81 \pm 0,03$	$29,0 \pm 0,47$
5	$60 \pm 0,05$	$1,906 \pm 0,13$	$1,90 \pm 0,03$	$30,5 \pm 0,47$

4.1.2 - Massa corporal:

Os dados referentes à massa corporal estão ilustrados na Figura 4.1. No início do estudo, os animais de todos os grupos apresentaram massa corporal similar ($P > 0,05$). Após o período de 5 semanas de treinamento os animais de todos os grupos exibiram um aumento estatisticamente significativo em suas massas corpóreas ($p < 0,0001$). No entanto, comparando as massas corpóreas finais dos grupos, foi possível identificar um menor peso no grupo 4 (submetido ao exercício e laser - $257,45 \pm 22,98g$) em relação ao grupo 1 (controle-padrão - $286,17 \pm 24,94g$) - $p < 0,05$). Isso indica um menor ganho de peso pelo grupo 4, sugerindo uma maior atividade metabólica em relação ao grupo 1, tendo em vista que os animais daquele grupo foram submetidos aos *stress* do exercício associado ao laser.

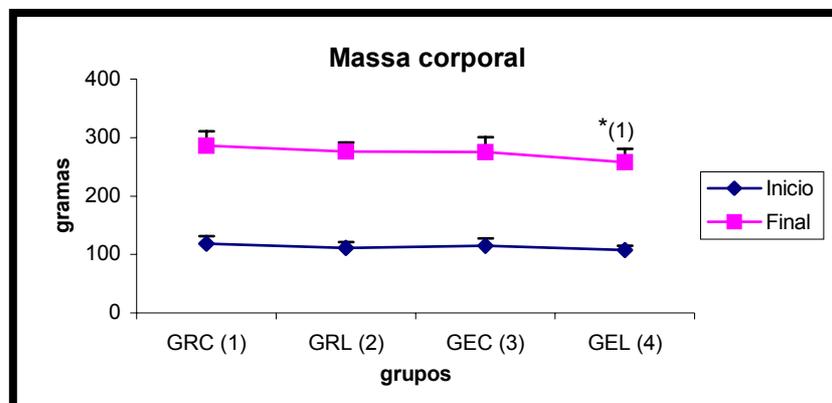


Figura 4.1 - Massa corporal inicial e final dos animais dos 4 grupos estudados. Valores referentes à média e desvio-padrão

4.1.3 - Massa muscular:

Os dados referentes à massa muscular do sóleo, TA e coração para os grupos estudados podem ser visualizados na Figura 4.2. Pode-se observar que dos tecidos estudados o TA apresentou valor médio maior de massa muscular, seguido do coração e por último do sóleo. Entretanto, comparando-se os valores médios de massa muscular de cada tecido entre os diferentes grupos, não se observou diferença estatisticamente significativa.

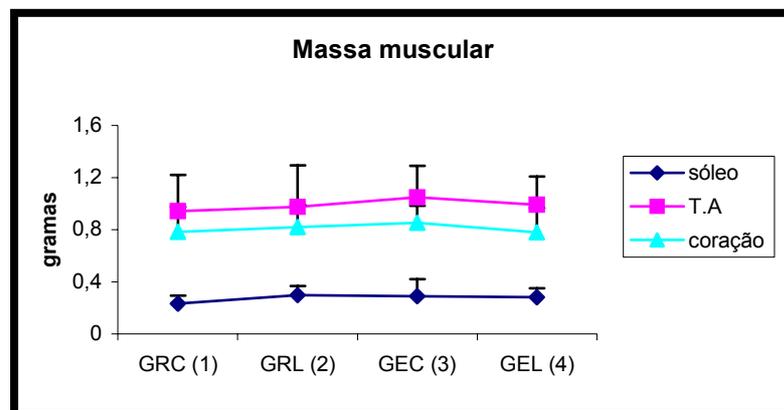


Figura 4.2 - Massa muscular dos músculos sóleo, TA e cardíaco nos 4 grupos estudados. Valores referentes à média e desvio-padrão

4.2– Respostas metabólicas à irradiação por laser

4.2.1 - Atividade da CS e LDH

A Figura 4.3 mostra os valores da atividade da CS nos três músculos de cada um dos grupos analisados. Como esperado, as atividades mais altas da CS foram detectadas em extratos de coração dos 4 grupos analisados, seguindo-se das detectadas em extratos de sóleo, e, as mais baixas detectadas em extratos de TA. Como pode ser observado, ocorre um aumento estatisticamente significativo na atividade dessa enzima em extrato de músculo cardíaco do grupo 4 ($P < 0,01$) (Figura 4.3a) em relação aos outros grupos (1, 2 e 3), bem como, do grupo 3 ($P < 0,05$) em relação ao 1.

Foi possível identificar também um aumento estatisticamente significativo na atividade enzimática em extrato de sóleo do grupo 4 ($P < 0,05$) em relação aos outros grupos (Figura 4.3b). Já para atividade detectada em extratos de TA, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apesar do grupo 4 apresentar, novamente, o maior valor médio de atividade (Figura 4.3b).

Para a enzima LDH, na presença de 1mM de piruvato, os resultados estão ilustrados na Figura 4.4. Nos três músculos analisados, a atividade da LDH detectada no grupo 1, ou seja, aquele que não recebeu qualquer tipo de estímulo, se mostrou maior em relação aos outros três grupos experimentais. No caso do músculo sóleo pode-se observar que no grupo 1 essa diferença foi estatisticamente significativa em relação aos grupos 2 ($P < 0,05$) e 4 ($P < 0,01$). Também a diferença detectada na atividade da LDH de sóleo do grupo 3 (exercício controle) mostrou-se estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo 4, que além do exercício foi irradiado por laser. Em extratos de TA, o grupo 1 apresentou atividade enzimática superior e estatisticamente significativa em relação aos grupos 2 ($P < 0,05$) e 3 ($P < 0,01$). Por outro lado, comparando-se os grupos submetidos ao exercício, foi possível identificar uma atividade maior no grupo irradiado por laser, diferentemente do observado nos músculos sóleo e cardíaco, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Em extratos de coração, o grupo 1, apresentou atividade da LDH superior aos outros três grupos experimentais, diferença esta estatisticamente significativa ($P < 0,01$). Além disso, pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos ao exercício ($P < 0,05$), tendo o grupo irradiado apresentado menor atividade.

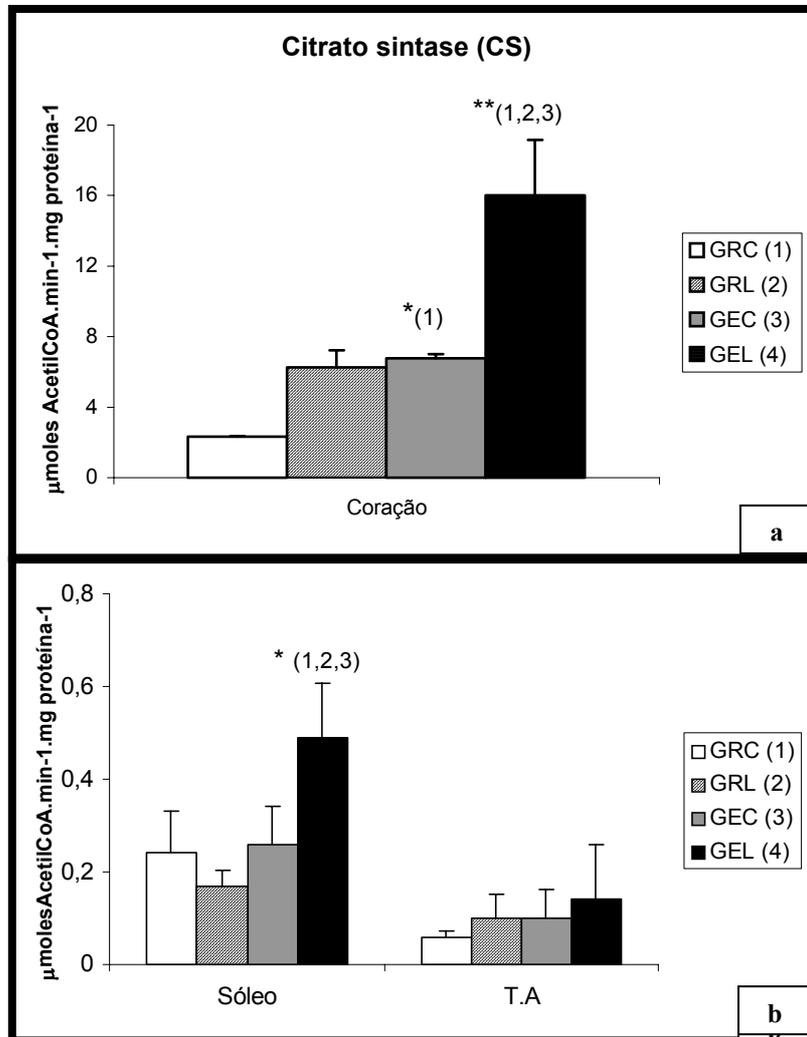


Figura 4.3 - Atividade da enzima CS em extratos dos músculos cardíaco (a), sóleo e TA (b) dos quatro grupos estudados. Valores referentes à média e desvio-padrão. **significância estatística – $P < 0,01$; *significância estatística – $P < 0,05$

Os resultados referentes à atividade da LDH na concentração de 10 mM de substrato podem ser visualizados na Figura 4.5. Apesar de ter ocorrido diminuição na atividade da LDH nos três músculos dos 4 grupos analisados quando comparado aos valores encontrados na concentração de 1 mM, já que aquela concentração foi inibitória, houve um comportamento semelhante ao encontrado na atividade dessa enzima na concentração menor de substrato (1mM). A única diferença evidente em relação à concentração de 1mM foi observada no músculo TA, quando da comparação entre os grupos submetidos ao exercício, na qual o grupo irradiado (grupo 4) apesar de apresentar atividade maior, tal diferença não se mostrou estatisticamente significativa.

Ao traçar uma relação entre os tecidos dos diferentes grupos analisados para CS pode-se observar que nos animais do grupo 1, a atividade da CS de coração ($2,34 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$) foi de 9,75 vezes maior do que a de músculo sóleo ($0,24 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$) e de 39 vezes maior que a de TA ($0,06 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$). Nos animais do grupo 2, a atividade da CS de coração ($6,25 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$) foi de 37 vezes maior do que a de músculo sóleo ($0,17 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$) e de 63 vezes maior que a de TA ($0,10 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$). Esses resultados em relação ao grupo 1, evidenciam uma ativação da CS em 167% no coração, uma inibição de 29% no sóleo e, uma ativação de 66% em TA, provocados, provavelmente, pela ação do laser (Figura 4.6a-c). Nos animais do grupo 3, a atividade da CS de coração ($6,76 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$) foi de 26 vezes maior do que a de músculo sóleo ($0,26 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$) e de 68 vezes maior que a de TA ($0,10 \mu\text{moles acetil-CoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$). Esses resultados em relação ao grupo 1, evidenciam uma ativação da CS em 189% no coração, de 8% no sóleo e, de 66% em TA, provocados, provavelmente, pela ação do exercício (Figura 4.6a-c).

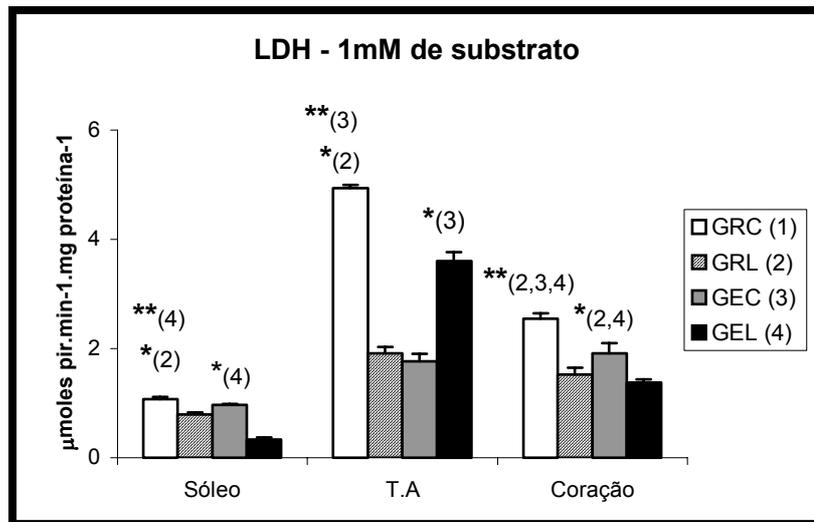


Figura 4.4 - Atividade da LDH em extratos dos músculos sóleo, TA e cardíaco dos quatro grupos estudados, em 1mM de piruvato. Valores referentes à média e desvio-padrão. **significância estatística – $P < 0,01$; *significância estatística – $P < 0,05$

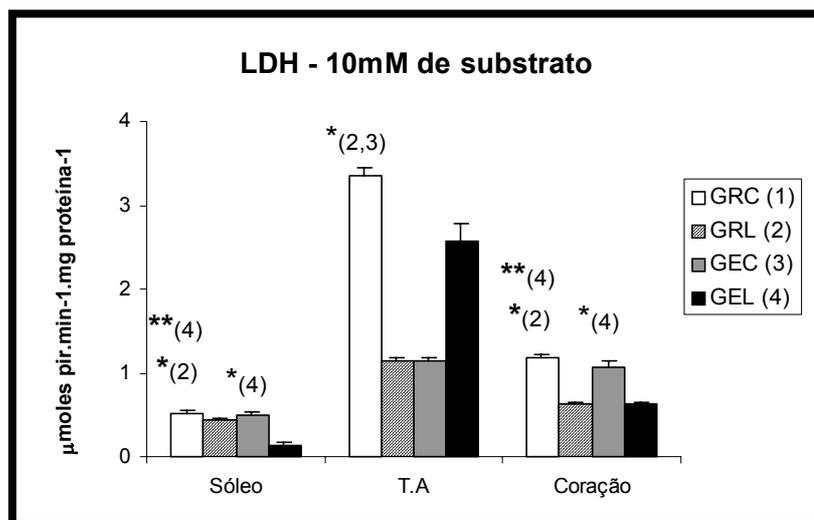


Figura 4.5 - Atividade da LDH em extratos dos músculos sóleo, TA e cardíaco dos quatro grupos estudados, em 10mM de piruvato. Valores referentes à média e desvio-padrão. **significância estatística – $P < 0,01$; *significância estatística – $P < 0,05$

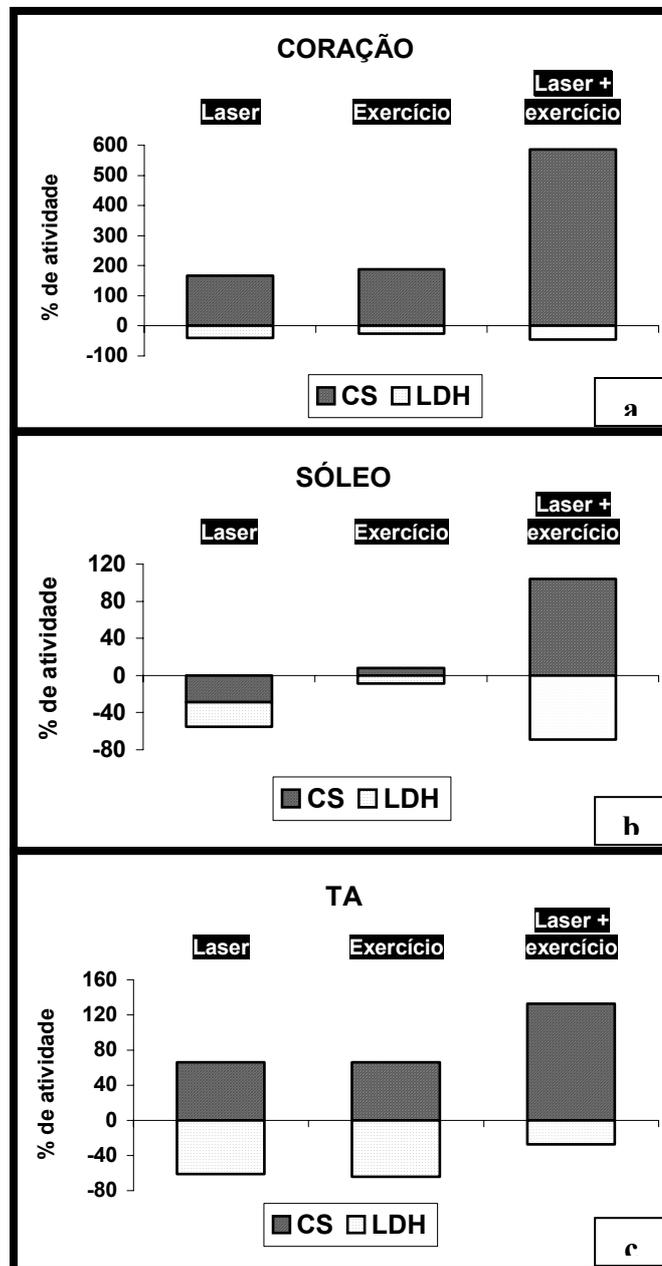


Figura 4.6 – Efeito do laser (grupo 2), exercício (grupo 3) ou ação de ambos = L + E (grupo 4) sobre a atividade enzimática da CS e LDH nos tecidos analisados em relação ao controle. Valores positivos = ativação; valores negativos = inibição

No grupo 4, a atividade da CS de coração ($16,02 \mu\text{moles acetil-CoA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$) foi de 33 vezes maior que a de m\`{u}sculo s\`{o}leo ($0,49 \mu\text{moles acetil-CoA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$) e de 114 vezes maior que a de TA ($0,14 \mu\text{moles acetil-CoA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$). Esses resultados em rela\`{c}\~{a}o ao grupo 1, evidenciam uma ativa\`{c}\~{a}o da CS em 585% no cora\`{c}\~{a}o, de 104% no s\`{o}leo e, de 133% em TA, provocados, provavelmente, pela a\`{c}\~{a}o conjunta do exerc\`{i}cio e laser (Figura 4.6a-c). Do mesmo modo, esses resultados em rela\`{c}\~{a}o ao grupo 3, evidenciam uma ativa\`{c}\~{a}o da CS em 137% no cora\`{c}\~{a}o, de 88% no s\`{o}leo e, de 40% em TA, provocados, provavelmente, pela a\`{c}\~{a}o apenas do laser, na presen\`{c}a do exerc\`{i}cio (Figura 4.7).

Por outro lado, considerando as rela\`{c}\~{o}es teciduais para a LDH nos diferentes grupos estudados foi poss\`{i}vel identificar que nos animais do grupo 1, a atividade da LDH de TA ($4,94 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$) foi de 4,76 vezes maior do que a de m\`{u}sculo s\`{o}leo ($1,07 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$) e de 1,9 vezes maior que a de cora\`{c}\~{a}o ($2,55 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$). Nos animais do grupo 2, a atividade da LDH de TA ($1,91 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$) foi de 2,4 vezes maior do que a de m\`{u}sculo s\`{o}leo ($0,79 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$) e de 1,3 vezes maior que a de cora\`{c}\~{a}o ($1,52 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$). Esses resultados em rela\`{c}\~{a}o ao grupo 1, evidenciam inibi\`{c}\~{o}es da LDH em 61% no TA, de 26% no s\`{o}leo e de 40% no cora\`{c}\~{a}o, provocados, provavelmente, pela a\`{c}\~{a}o do laser (Figura 4.6a-c). Nos animais do grupo 3, a atividade da LDH de TA ($1,77 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$) foi de 1,8 vezes maior que a de m\`{u}sculo s\`{o}leo ($0,97 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$) e, ligeiramente menor que a de cora\`{c}\~{a}o ($1,91 \mu\text{moles pir}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\`{i}na}^{-1}$). Esses resultados em rela\`{c}\~{a}o ao grupo 1, evidenciam inibi\`{c}\~{o}es da LDH em 64% no TA, de 9% no s\`{o}leo e, de 25% em cora\`{c}\~{a}o, provocados, provavelmente, pela a\`{c}\~{a}o do exerc\`{i}cio (Figura 4.6a-c).

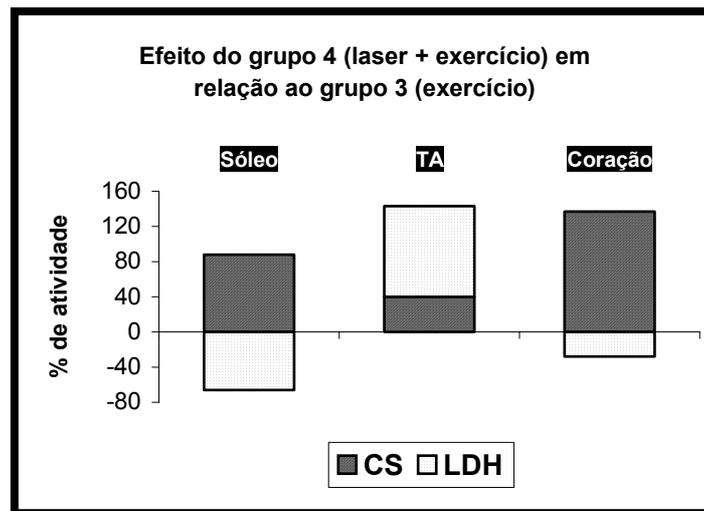


Figura 4.7 - Efeito do laser na presença do exercício = L+E (grupo 4) sobre a atividade enzimática da CS e LDH nos tecidos analisados em relação ao seu controle (grupo 3). Valores positivos = ativação; valores negativos = inibição

No grupo 4, a atividade da LDH de TA ($3,6 \mu\text{moles pir. min}^{-1}.\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$) foi de 11 vezes maior do que a de m\`usculo s\`oleo ($0,33 \mu\text{moles pir. min}^{-1}.\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$) e de 2,6 vezes maior que a de cora\`cao ($1,38 \mu\text{moles pir. min}^{-1}.\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$). Esses resultados em rela\`cao ao grupo 1, evidenciam inibi\`coes da LDH em 27% no TA, de 69% no s\`oleo e, de 46% em cora\`cao, provocados, provavelmente, pela a\`cao conjunta do exerc\`icio e laser (Figura 4.6a-c). Do mesmo modo, esses resultados em rela\`cao ao grupo 3, evidenciam ativa\`cao da LDH em 103% no TA e inibi\`coes de 66% no s\`oleo e, de 28% em cora\`cao, provocados, provavelmente, pela a\`cao apenas do laser, na presen\`ca do exerc\`icio (Figura 4.7).

4.2.2 – Raz\`ao B / A

As raz\`oes B/A (atividade da LDH em baixa concentra\`ao de substrato / atividade da LDH em alta concentra\`ao de substrato) servem como indicadores da ocorr\`encia ou n\`ao de modifica\`oes no tipo de subunidade (isoforma) da enzima predominante em cada tecido atrav\`es do seguinte crit\`erio: valores superiores a 1 (um) s\`ao indicativos do predom\`nio da subunidade B e, conseq\`entemente, do metabolismo oxidativo, tendo em vista esta ser considerada *lactato oxidase* e a sua atividade ser inibida em 10mM de piruvato. Por outro lado, valores inferiores a 1 indicam o predom\`nio da subunidade A, t\`ipica do metabolismo glicol\`tico, sendo considerada *piruvato redutase* e sua atividade n\`ao inibida por altas concentra\`oes de piruvato. De acordo com a Figura 4.8a, pode-se observar que houve um predom\`nio da subunidade B para todos os tecidos considerando que todos os valores se mostraram maior que 1, sendo tal predom\`nio e portanto, alta inibi\`ao \` concentra\`ao de 10mM, maior nos m\`usculos s\`oleo e card\`aco, cuja inibi\`ao variou entre 40 a 60%, comparado a menor inibi\`ao presente no m\`usculo TA, variando entre 20 a 40% (Figura 4.8b).

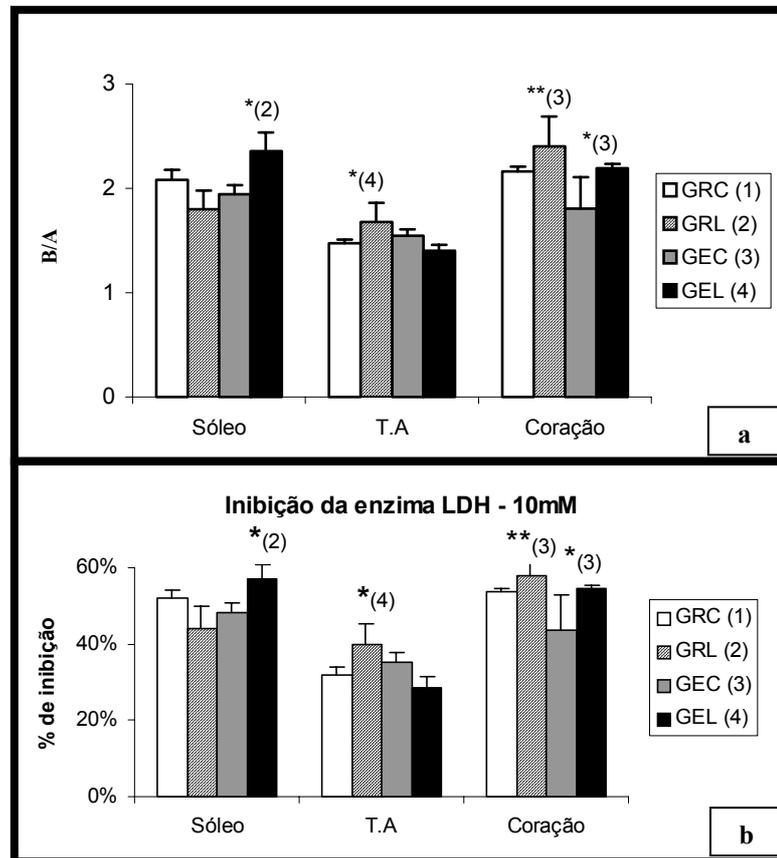


Figura 4.8 - Razões B/A de atividade da LDH (a) e porcentagem da inibição em 10mM (b), para os 3 músculos nos quatro grupos estudados. Valores referentes à média e desvio-padrão. **significância estatística - P < 0,01; *significância estatística - P < 0,05. Atividade enzimática expressa em $\mu\text{moles pir. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Especificamente em extratos de sóleo, o grupo 4 foi o que apresentou maior valor de B/A (2,36), estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação ao grupo 2. Em extratos de coração, o grupo 2 apresentou o maior valor de B/A (2,4) sendo estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação ao grupo 3, e o grupo 4, com um valor de B/A de 2,2, estatisticamente diferente ($P < 0,05$) também em relação ao grupo 3. Em extratos de TA, o valor de B/A mais baixo detectado para os 4 grupos e também, para os 3 músculos, foi obtido no grupo 4 (1,4). O grupo 2 apresentou o maior valor de B/A (1,7) e mostrou-se estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação ao grupo 4.

Em extratos de sóleo, o grupo 4 foi o que apresentou maior valor de inibição em 10mM (57,04%) e no coração ambos os grupos submetidos a irradiação por laser apresentaram valores percentuais de inibição em 10mM maior (58,02% e 54,41%) em relação aos seus controles (grupos 1 – 53,78% e 3 – 43,64%), respectivamente. Para o músculo TA somente o grupo 2, com maior inibição, se mostrou estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação ao grupo 4.

Considerando relações das razões B / A entre os tecidos para os diferentes grupos foi possível identificar que nos animais do grupo 1, as razões B/A foram de 1,5 (menor quantidade de subunidades B, inibição de 32%) em TA, 2,1 (52% de inibição) em sóleo e, 2,2 (54% inibição) em coração. Nos animais do grupo 2, as razões B/A foram de 1,7 (40% de inibição) em TA (portanto um aumento de inibição ou uma diminuição de subunidades A de 8% em relação ao grupo controle), 1,8 (44% de inibição) em sóleo (portanto uma diminuição da inibição ou aumento de subunidade A em 8%) e, 2,4 (58% inibição) em coração (portanto um aumento de inibição ou diminuição de subunidades A em 4%), provocados, provavelmente pela ação do laser nesse grupo. Nos animais do grupo 3, as razões B/A foram de 1,5 (35% de inibição) em TA (portanto um aumento de inibição ou diminuição de subunidades A de 3% em relação ao grupo controle), 1,9 (48% de inibição) em sóleo

(portanto uma diminuição da inibição ou aumento de subunidades A em 4%) e, 1,8 (44% inibição) em coração (portanto uma diminuição de inibição ou aumento de subunidades A em 10%), provocados, provavelmente pela ação do exercício nesse grupo. No grupo 4, as razões B/A foram de 1,4 (29% de inibição) em TA (portanto um aumento de inibição ou diminuição de subunidades A de 3% em relação ao grupo controle), 2,4 (57% de inibição) em sóleo (portanto um aumento da inibição ou diminuição de subunidades A em 5% em relação ao controle) e, 2,2 (54% inibição) em coração (portanto sem alterar a inibição ou a quantidade de subunidades B) provocados, provavelmente, pela ação conjunta do exercício e laser. Do mesmo modo, em relação ao grupo 3, foi mostrada uma diminuição de inibição ou aumento de subunidades A em 3% no TA, um aumento de inibição ou diminuição de subunidade A em 9% em sóleo e, um aumento de inibição ou diminuição de subunidades A em 10% em coração, provocados, provavelmente, pela ação apenas do laser, na presença do exercício.

4.2.3 – Razão LDH / CS

A relação entre a atividade das enzimas LDH à 1mM de substrato e CS possibilita a inferência do perfil metabólico dos tecidos, a partir do seguinte critério: valores dessa relação superior a 1 são indicativos de predomínio do metabolismo anaeróbio, tendo em vista o numerador ser constituído pela LDH, enzima chave no metabolismo glicolítico. Por outro lado, valores inferiores a 1 indicam o predomínio do metabolismo aeróbio, pois o denominador é formado pela CS, enzima do metabolismo oxidativo. Assim, a atividade da LDH em 1mM mostrou-se maior que a da CS nos 4 grupos para TA (Figura 4.9a), em três dos quatro grupos, para sóleo (Figura 4.9b), com exceção do grupo 4 e, no grupo 1 para coração (Figura 4.9c), tendo em vista a obtenção de valores acima de 1, o que sugere um predomínio no metabolismo anaeróbio. Em extratos de músculo cardíaco, observa-se valores predominantemente menores que 1 para os grupos 2, 3 e 4, sugerindo um predomínio do

metabolismo aeróbio (Figura 4.9c). A análise comparativa de extratos dos três músculos analisados evidencia maiores relações LDH/CS no grupo controle em relação aos demais.

Para extratos de TA, pode-se observar diferença estatisticamente significativa somente do grupo 1 (LDH/CS = 77,37) em relação aos grupos 2 e 3 (LDH/CS = 23,71 e 22,76, $P < 0,05$, respectivamente) (Figura 4.9a). Baseado nos valores obtidos para TA, é possível concluir que esse tecido foi o que apresentou maior predomínio no metabolismo glicolítico.

Em extratos de sóleo, a relação detectada no grupo 1 mostrou-se estatisticamente diferente (LDH/CS = 5,02, $P < 0,05$) em relação ao grupo 4 (LDH/CS = 0,71), o qual foi submetido ao estímulos de exercício e laser (Figura 4.9b). Também a segunda maior relação LDH/CS obtida no grupo 2 (4,87) mostrou-se estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação ao grupo 4.

Em extratos de músculo cardíaco, a diferença detectada no grupo 1 (LDH/CS = 1,1) foi estatisticamente significativa em relação aos grupos 2 (LDH/CS = 0,24, $P < 0,05$) e 4 (LDH/CS = 0,09, $P < 0,01$) que foram submetidos a irradiação laser (Figura 4.9c). Também a diferença detectada na relação LDH/CS do grupo 3 (0,28) mostrou-se estatisticamente significativa em relação ao grupo 4 ($P < 0,05$).

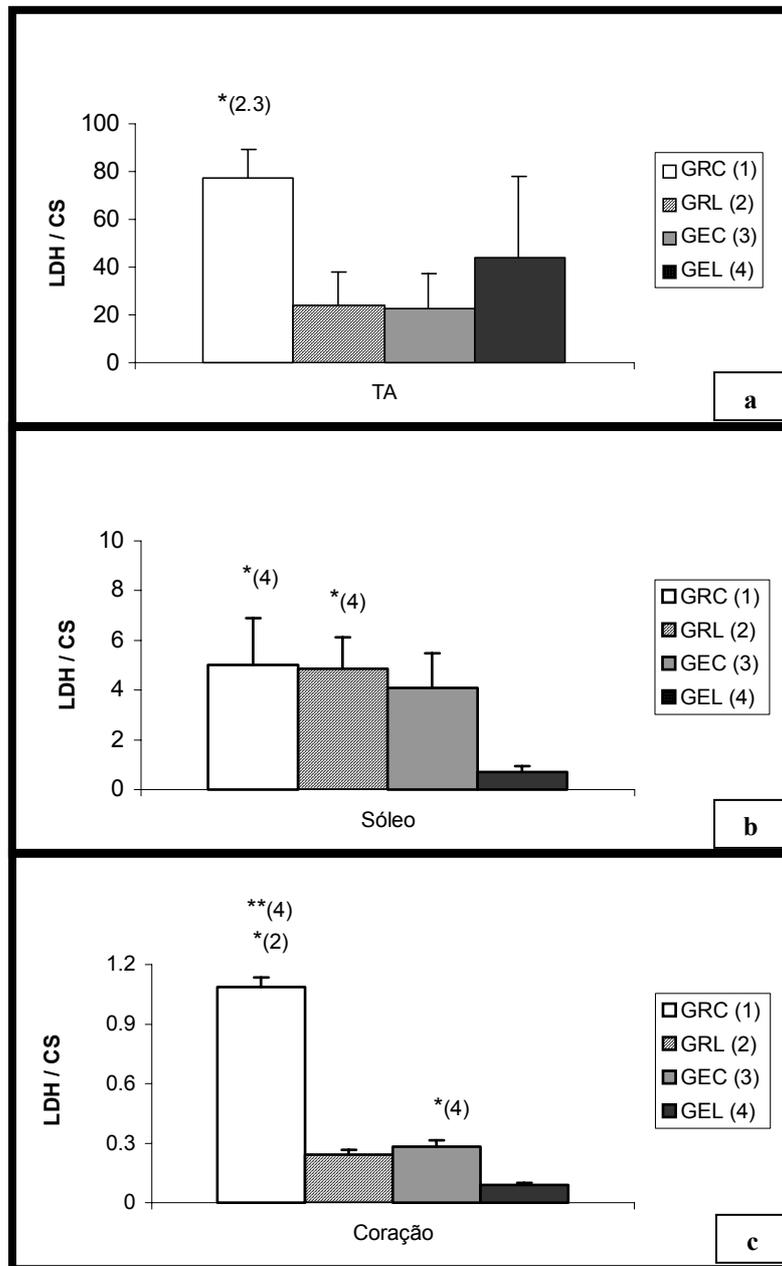


Figura 4.9 - Razões de atividade LDH/CS detectados em TA (a), sólido (b) e coração (c) nos quatro grupos estudados. Valores referentes à média e desvio-padrão. **significância estatística - $P < 0,01$; *significância estatística - $P < 0,05$. Atividade enzimática expressa em $\mu\text{moles substrato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

Considerando relações da razão LDH/CS entre os tecidos para os grupos analisados foi possível identificar que em animais do grupo 1, a razão LDH/CS foi de 1,1 em coração (sem predominância de um tipo de metabolismo), diferentemente do que seria esperado em se tratando de um músculo aeróbio. Entretanto, a maior diferença em relação ao esperado ocorreu em sóleo onde a razão LDH/CS foi de 5. Esses dados sugeririam que o músculo sóleo desses animais mantém seu metabolismo sustentado principalmente pela glicólise anaeróbia, envolvendo a mobilização da glicose e a produção do lactato, como em músculo TA (77,4). Nos animais do grupo 2, a razão LDH/CS foi de 0,24 em coração, 4,9 em sóleo (inesperado) e 23,7 em TA. Isso indicaria nesse grupo em relação ao controle, aumentos no metabolismo aeróbio na ordem de 78% em extratos de coração, de 2% nos de sóleo, e de 69% nos de TA, que poderiam ser analisados como provocados pelo laser (Figura 4.10a-c). Já no grupo 3, a razão LDH/CS foi 0,28 no coração, 4,1 no sóleo e 22,8 no TA. Em relação ao controle, pode-se interpretar esses aumentos no metabolismo aeróbio de 75% no coração, de 18% no sóleo e de 71% no TA como causados pelo exercício (Figura 4.10a-c). Nos animais do grupo 4, em relação ao controle, essas razões foram de 0,09 no coração, de 0,71 em sóleo e de 43,9 em TA, o que indicariam aumentos no metabolismo aeróbio de 92% no coração, de 86% no sóleo e de 43% no TA provocados pela ação conjunta do laser e exercício (Figura 4.10a-c). Em relação ao grupo 3, esses valores indicariam aumentos de 68% no coração e de 83% no sóleo, do metabolismo aeróbio e de 93% no TA do anaeróbio, devido somente ao laser na presença do exercício (Figura 4.11a-b).

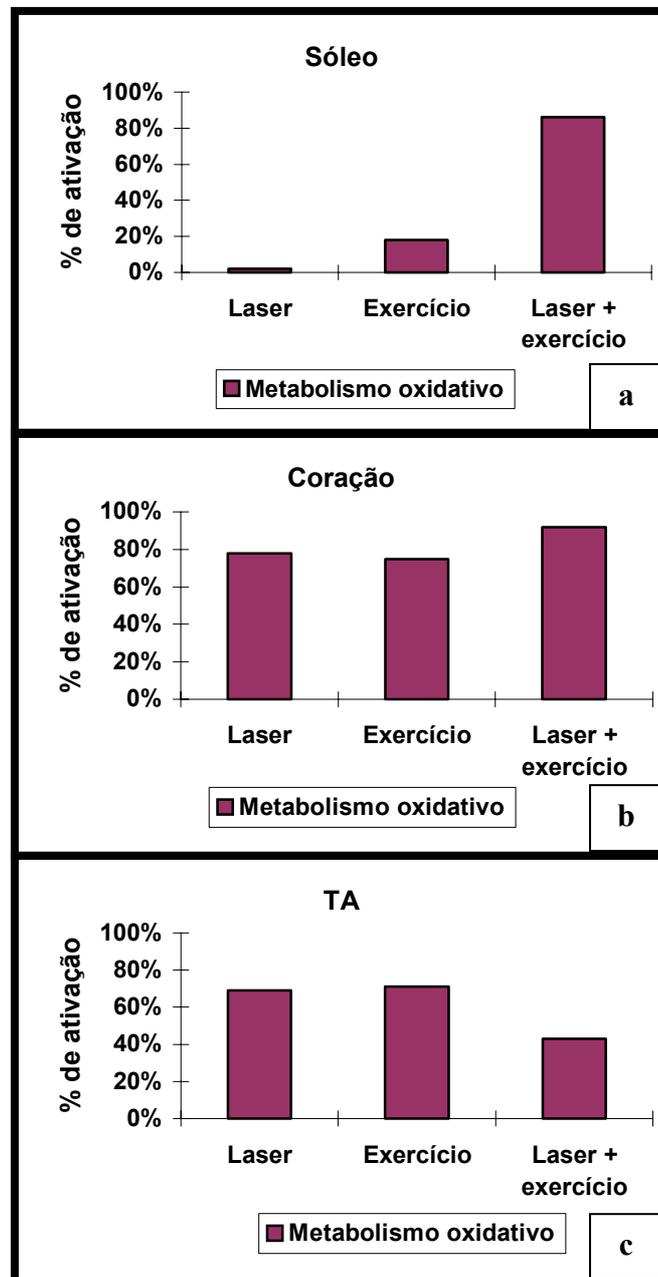


Figura 4.10 – Efeito do laser (grupo 2), exercício (grupo 3) e suas ações combinadas (grupo 4) em relação ao seu controle sobre o tipo de metabolismo detectado (a partir das relações de atividade LDH/CS) em coração e sóleo (a) e TA (b)

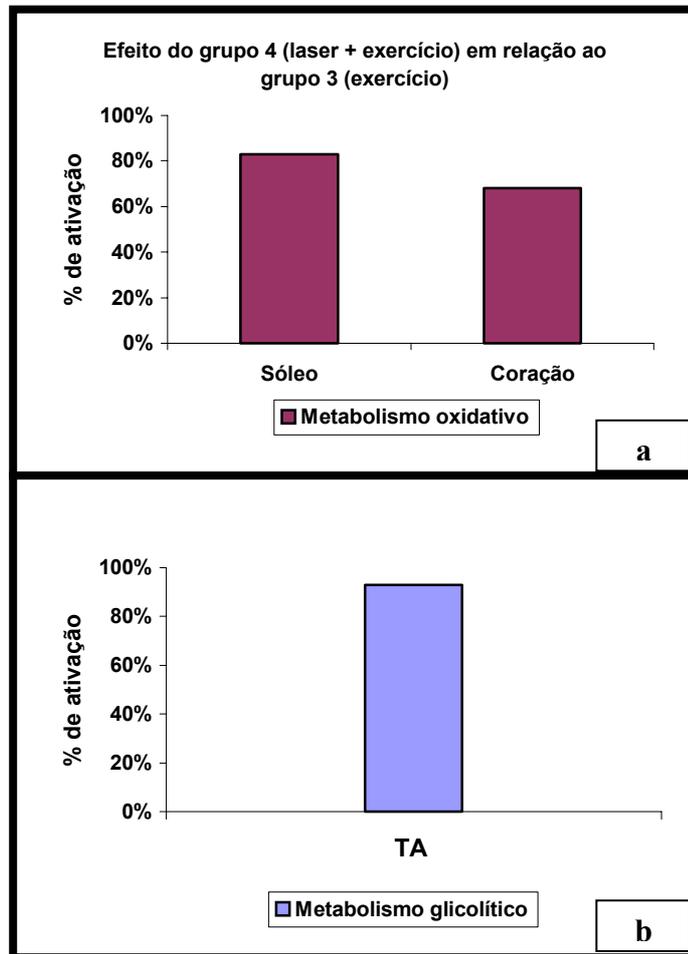


Figura 4.11 – Efeito do laser na presença do exercício (grupo L+E ou 4) em relação ao seu controle (grupo 3) sobre o tipo de metabolismo detectado (a partir das relações de atividade LDH/CS) em coração e sóleo (a) e TA (b)

4.3 – Expressão/atividade dos loci duplicados da LDH obtidos através de eletroforese e espectrofotometria

Com relação aos padrões eletroforéticos da LDH dos músculos sóleo, TA e cardíaco, os resultados obtidos não mostraram diferenças significantes entre os grupos estudados, no que se refere a suas intensidades relativas e número dos componentes. Diferentemente do que ocorre na maioria dos vertebrados, a isoforma A₄ ou M₄, produto do locus *LDH-A**, não se apresentou predominante em extratos de TA, tecido predominantemente anaeróbico, em nenhum dos grupos analisados, nem se quer foi detectada. O produto do locus *LDH-A** apareceu apenas na forma de heteropolímeros, inclusive nos outros 2 tecidos analisados. Já o produto do locus *LDH-B**, o homopolímero B₄ ou H₄ foi predominante em extratos de sóleo e coração, como já esperado. A figura 4.12 ilustra o padrão eletroforético detectado em extratos de sóleo, coração e TA do grupo submetido ao exercício e laser (grupo 4), tendo em vista este ter apresentado padrões mais definidos/claros.

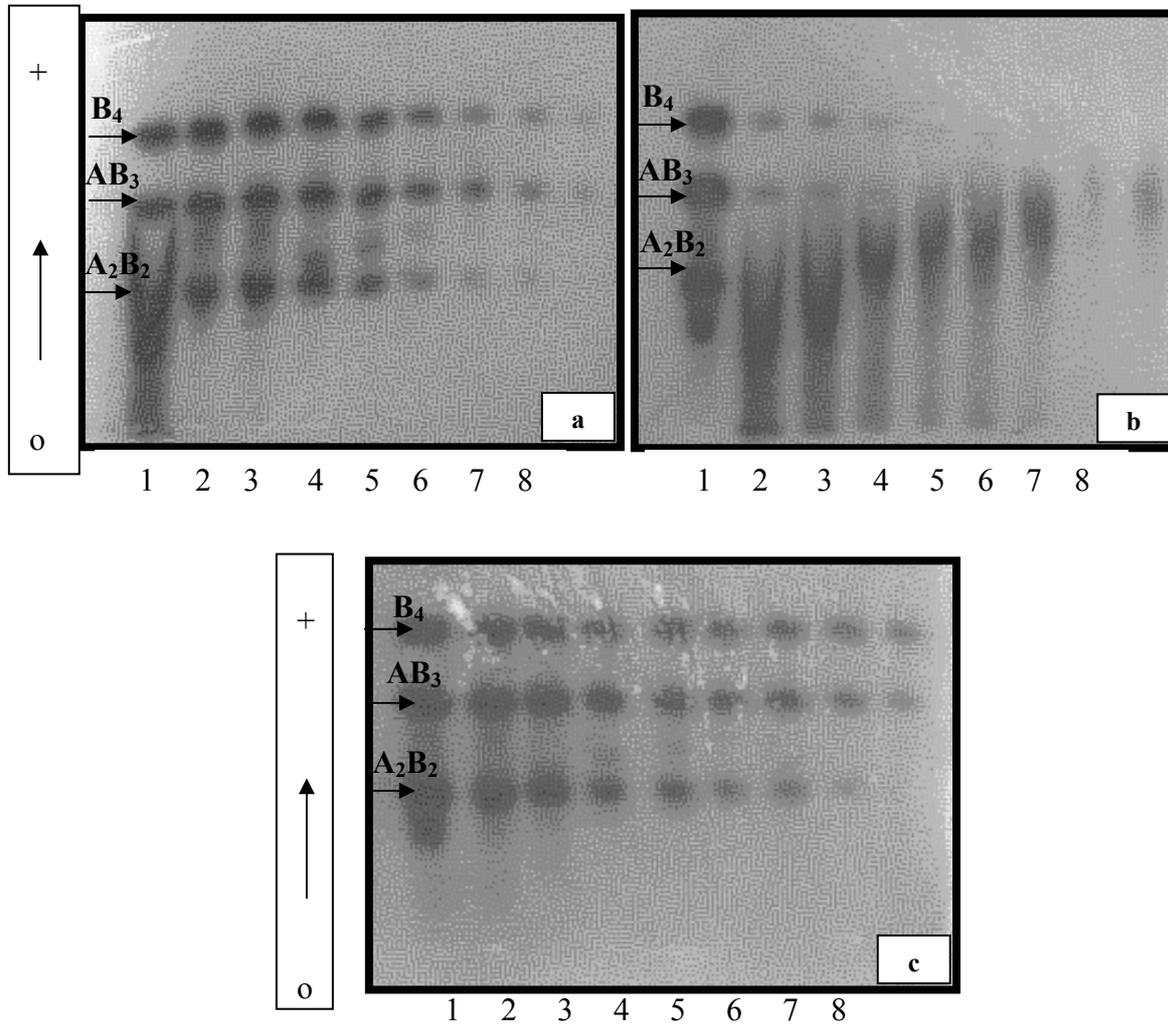


Figura 4.12 - Pontos visuais finais das isoformas da LDH detectado em extratos de músculos sóleo (**a**), TA (**b**) e cardíaco (**c**) de animais do GEL. o = ponto de origem da migração; ↑ = sentido da migração; 1-8 = diluições segundo Klebe (1975)

Uma vez que as bandas com atividade enzimática que aparecem nos zimogramas refletem o produto final da reação, sua quantificação através da densitometria não reflete a concentração enzimática presente na amostra. No caso de proteínas, dentro de uma certa faixa, a densitometria reflete exatamente a concentração dessa na amostra, uma vez que cada banda eletroforética é estequiométrica a quantidade de corante nela depositado. Assim sendo, para a análise comparativa da atividade das isoformas da LDH nos grupos em estudo, foi utilizado o procedimento de diluições seriadas de Klebe (1975), que determina os pontos visuais finais de cada homopolímero nos extratos teciduais (sóleo, TA e coração) para os 4 grupos analisados (Quadro 4.1). Assim, pode-se observar que em nenhum tecido estudado houve o aparecimento do homopolímero A₄ típico de tecidos com características fisiológicas predominantemente anaeróbias. No que se refere às proporções obtidas das duas subunidades nos diferentes tecidos, pode-se observar que nos músculos sóleo e cardíaco, os quais são fisiologicamente adaptados para o metabolismo aeróbio, houve um predomínio, para todos os grupos, da subunidade B (típica de tecidos com metabolismo predominantemente oxidativo) em relação à subunidade A, cujos valores variaram de 1,7B : 1A à 1,4B : 1A (0,67 : 0,4 à 0,19 : 0,4), numa média de 1,5 subunidades B para 1 de A (0,47 : 0,38) no sóleo e de 1,7B : 1A à 1,4B : 1A (1,61 : 0,94 à 0,81 : 0,58) numa média de 1,5 subunidades B para 1 de A (1,1 : 0,73) no coração. Por outro lado, no músculo T.A que possui características fisiológicas de metabolismo anaeróbio, houve um predomínio, para todos os grupos, da subunidade A (típica de tecidos com metabolismo predominantemente glicolítico) em relação a B, cujos valores variaram de 1B : 1,2A à 1B : 1,7B (2,25 : 2,69 à 0,66 : 1,11) numa média de 1,4 subunidade A para 1 de B (1,32 : 1,74), conforme pode ser visualizado nos Quadros 4.2 e 4.3.

Quadro 4.2 –Variação da expressão dos locus duplicados da LDH em músculos sóleo, TA e cardíaco nos quatro grupos de ratos analisados

LDH	(1) GRC	(2) GRL	(3) GEC	(4) GEL	Proporção média
Sóleo	1,7B : 1A	1,4B : 1A	1,4B : 1A	1,4B : 1A	1,475 ± 0,15 : 1
TA	1B : 1,2A	1B : 1,2A	1B : 1,7A	1B : 1,4A	1 : 1,375 ± 0,24
Coração	1,7B : 1A	1,4B : 1A	1,4B : 1A	1,4B : 1A	1,475 ± 0,15 : 1

Quadro 4.3 – Atividades dos produtos do locus *LDH-B** em relação ao do locus *LDH-A**, calculadas a partir das proporções detectadas pelo método de Klebe (1975). atividade ($\mu\text{moles de pir. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) obtida em 1mM de piruvato

LDH	(1) GRC	(2) GRL	(3) GEC	(4) GEL
Sóleo	0,67 : 0,4	0,46 : 0,33	0,57 : 0,4	0,19 : 0,4
TA	2,25 : 2,69	0,87 : 1,04	0,66 : 1,11	1,5 : 2,1
Coração	1,61 : 0,94	0,89 : 0,63	1,11 : 0,8	0,81 : 0,58

4.4 – Dosagem de lactato

Os dados da dosagem do lactato se referem à análise comparativa das médias da velocidade máxima da corrida e velocidade da corrida no momento do LA expressas em (m/min) durante os cinco testes de esforços crescentes e intervalados nos dois grupos submetidos ao treinamento aeróbio (grupos 3 e 4).

Primeiramente, no que se refere aos dados da velocidade máxima dos animais do grupo 3, pode-se observar que no decorrer das cinco avaliações houve um aumento na velocidade máxima atingida pelos animais, sendo esta diferença estatisticamente significativa entre a terceira, a quarta e a quinta avaliação ($43 \pm 9,04$ - $P < 0,05$; $44 \pm 12,63$ e $45 \pm 11,33$ - $P < 0,01$) respectivamente, em relação a primeira e/ou segunda avaliação (Figura 4.13a). Em relação ao grupo 4, pode-se observar também um aumento na velocidade máxima no decorrer das cinco avaliações, sendo esta diferença estatisticamente significativa entre a terceira, a quarta e a quinta avaliação ($41 \pm 4,85$; $45 \pm 4,65$ e $49 \pm 4,65$ - $P < 0,01$) respectivamente, em relação a primeira, segunda e/ou terceira avaliações (Figura 4.13b). Porém, não foi possível identificar diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, apesar do grupo submetido ao laser (grupo 4) ter apresentado, durante a quinta avaliação, maior valor de velocidade máxima ($49 \pm 4,65$) em relação ao apresentado pelo grupo 3 ($45 \pm 11,33$) durante a respectiva avaliação.

No que se refere à velocidade da corrida no momento do LA do grupo 3, pode-se observar o seu aumento no decorrer das cinco avaliações, sendo esta diferença estatisticamente significativa entre a quarta e a quinta avaliação ($36,69 \pm 10,51$ e $36,39 \pm 8,86$ - $P < 0,05$) respectivamente, em relação a primeira e a segunda avaliações (Figura 4.14a). Em relação ao grupo 4, pode-se observar também um aumento na velocidade máxima no decorrer das cinco avaliações, sendo essa diferença estatisticamente significativa da quinta avaliação

($39,89 \pm 5,10$ - $P < 0,01$) em relação a todas as outras avaliações, bem como, entre a terceira e a quarta avaliações ($30,33 \pm 6,14$ - $P < 0,05$ e $33,67 \pm 4,80$ - $P < 0,01$) respectivamente, em relação a primeira e/ou segunda avaliações (Figura 4.14b). Da mesma forma que para a velocidade máxima, não houve diferença estatisticamente significativa dessa variável entre os dois grupos, apesar do grupo submetido ao laser novamente apresentar maior valor durante a quinta avaliação ($39,89 \pm 5,10$) em relação ao apresentado pelo grupo 3 ($36,39 \pm 8,86$) durante a respectiva avaliação.

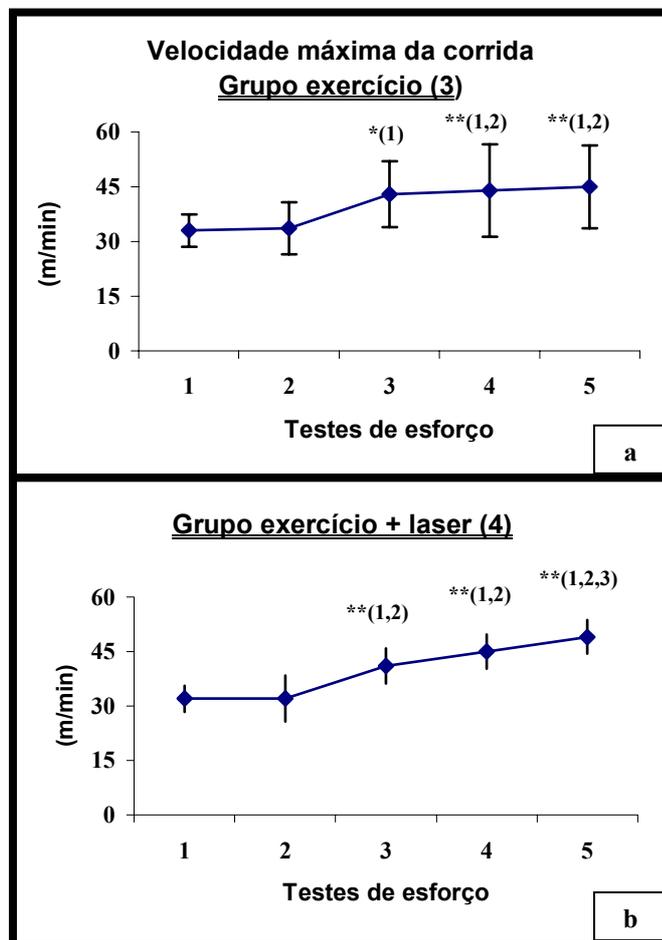


Figura 4.13 - Velocidade máxima durante as cinco avaliações do teste de esforço crescente e intervalado nos grupos submetidos ao exercício (a) e ao exercício e laser (b). Valores referentes à média e desvio-padrão. **significância estatística - $P < 0,01$; *significância estatística - $P < 0,05$

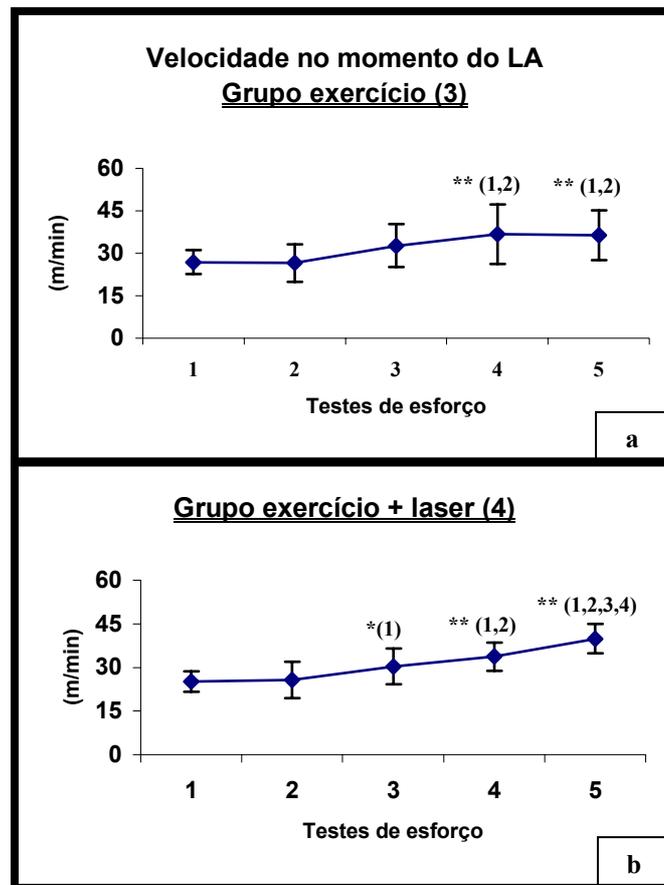


Figura 4.14 - Velocidade no momento do LA durante as cinco avaliações do teste de esforço crescente e intervalado nos grupos submetidos ao exercício (a) e ao exercício e laser (b). Valores referentes à média e desvio-padrão. **significância estatística - $P < 0,01$; *significância estatística - $P < 0,05$

No que se refere ainda aos dados do treinamento aeróbio, pode-se observar uma correlação direta entre a velocidade máxima da corrida e velocidade da corrida no momento do LA no decorrer das cinco avaliações, tanto para o grupo 3 ($r = 0,971$) quanto para o grupo 4 ($r = 0,979$) (Figura 4.15a-b).

Considerando a concentração de lactato sérico no momento do LA, pode-se observar uma ligeira tendência na sua redução no decorrer das cinco avaliações para o grupo 3 e praticamente uma manutenção ou pequena variação dos valores para o grupo 4. Entretanto, não houve alguma diferença estatisticamente significativa entre as semanas para cada grupo bem como entre ambos os grupos (Figura 4.16a-b).

Foi possível também traçar a curva de lactato \times esforço para os grupos 3 e 4, de modo que o LA se mostrou deslocado para um nível de esforço em torno de 45 m/min para ambos os grupos, tendo o grupo 4 exibido, do ponto de vista qualitativo, uma curva mais uniforme, ou seja, de aumento gradativo do esforço (Figura 4.17a-b).

Realizando uma interpretação geral dos dados referentes a dosagem do lactato, pode-se evidenciar um aumento na velocidade máxima atingida pelos animais e na velocidade no momento do LA a partir da terceira semana, bem como, uma ligeira tendência para a redução da quantidade de lactato sérico para os dois grupos analisados. No entanto, não se evidenciou alguma diferença estatisticamente significativa entre os grupos para essas variáveis. Por outro lado, é pertinente considerar que para o grupo 3 parece ocorrer uma estabilização (manutenção) do ganho aeróbio, representado pelas variáveis velocidade máxima e velocidade durante o LA, a partir da 4ª avaliação. Já para o grupo 4 isto não foi observado, tendo em vista os valores se mostrarem maior na 5ª avaliação (curva ascendente). Assim, será que se o período de treinamento fosse realizado por um período de tempo maior ocorreriam diferenças significativas entre os grupos? ou a partir de qual semana de treinamento os valores se estabilizariam?

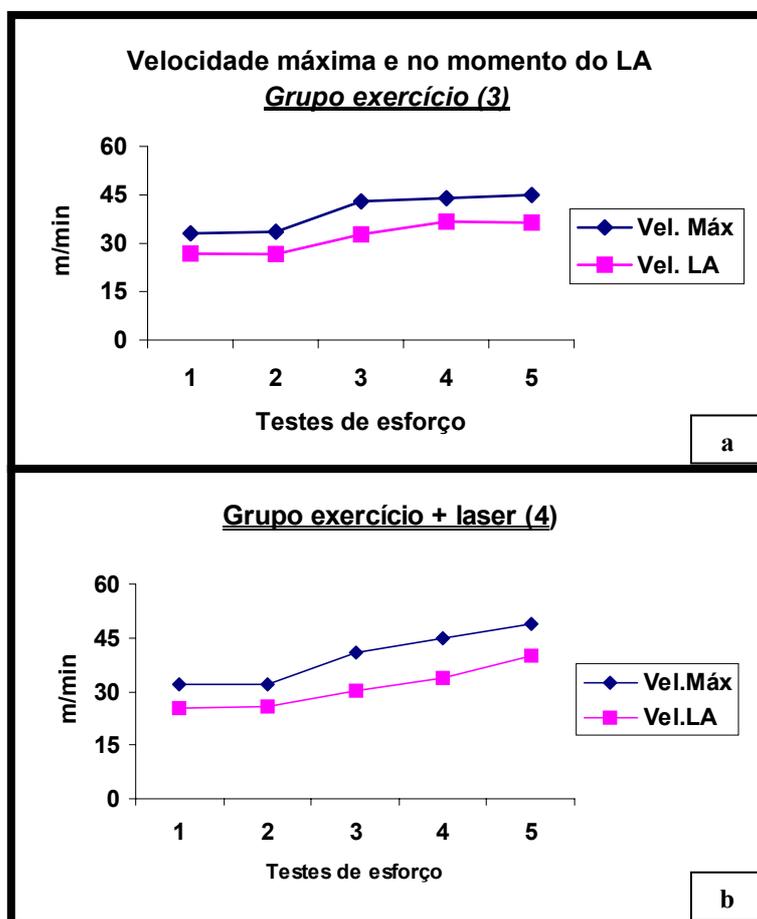


Figura 4.15 - Velocidade máxima da corrida e velocidade no momento do LA durante as cinco avaliações do teste de esforço crescente e intervalado nos grupos submetidos ao exercício (a) e ao exercício e laser (b)

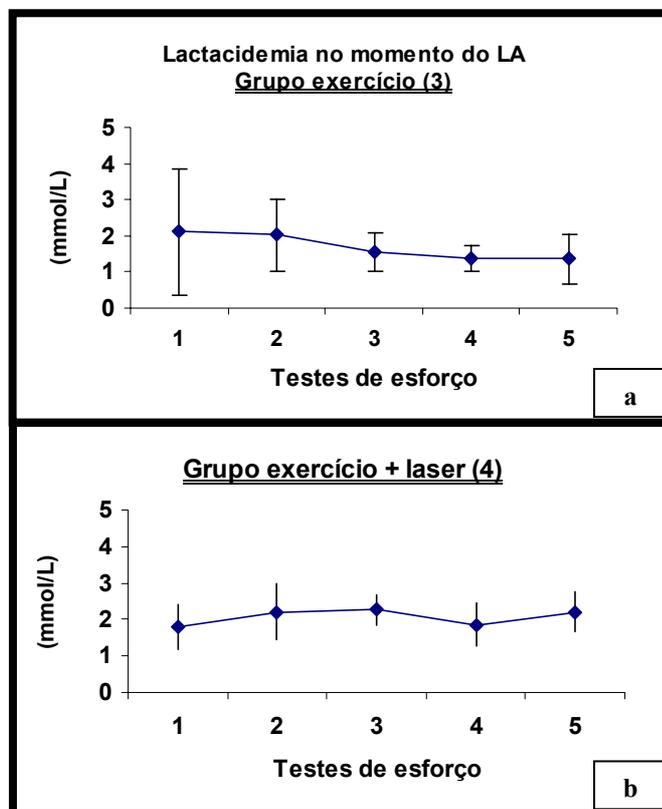


Figura 4.16 - Concentração de lactato sérico no momento do LA durante as cinco avaliações do teste de esforço crescente e intervalado nos grupos submetidos ao exercício (a) e ao exercício e laser (b). Valores referentes à média e desvio-padrão

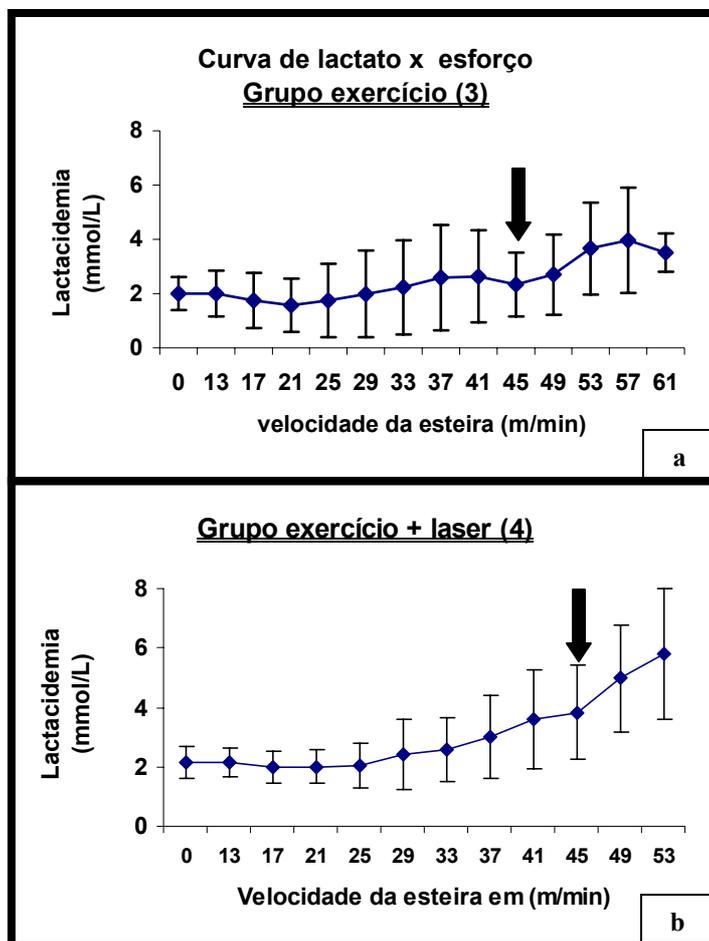


Figura 4.17 - Concentração de lactato sérico em relação ao aumento do esforço (curva de lactato sérico x esforço) dos animais dos grupos submetidos ao exercício (a) e ao exercício e laser (b). Valores referentes à média e desvio-padrão A seta indica o momento do LA

5 – DISCUSSÃO

O laser de baixa intensidade, apesar do pouco tempo de sua utilização na fisioterapia, vem sendo cada vez mais desenvolvido e estudado em laboratórios e na prática terapêutica, constituindo-se, atualmente, em uma das modalidades bioestimulantes mais utilizadas na reabilitação, o que tem contribuído para o melhor entendimento de seus princípios e aplicabilidades. No entanto, as evidências científicas e clínicas ainda são escassas e na maioria das vezes contraditórias, fato este que justifica a necessidade e importância da realização de pesquisas envolvendo esse recurso terapêutico.

Uma das evidências científicas sugeridas em decorrência da ação do laser sobre o metabolismo celular, consiste no aumento da taxa respiratória e conseqüentemente, na síntese de ATP celular mediante modificações químicas e estruturais de componentes celulares, em destaque a mitocôndria (KARU, 1987, 1995, 1998; BAKEEVA *et al.*, 1993; MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997; MORIMOTO *et al.*, 1994; PASSARELA *et al.*, 1984; PASSARELA *et al.*, 1988; PASTORE *et al.*, 1996; WILDEN; KARTHEIN, 1998; YU *et al.*, 1997). Entretanto, os estudos que sugerem essas respostas sobre o metabolismo energético, têm sido fundamentalmente, realizados *in vitro*. Assim, o presente estudo teve o propósito de investigar as adaptações fisiológicas relativas à atividade das enzimas CS e LDH, que ocupam posições chaves no metabolismo oxidativo e glicolítico, respectivamente, e ao Limiar de Anaerbiose (LA) em ratos sob treinamento aeróbio em esteira e submetidos a fotoestimulação por laser de baixa intensidade.

- **Massa corporal:**

O aumento na massa corporal observado após o período de experimentação (adaptação e treinamento em esteira) em todos os grupos foi evidente, tendo em vista o intervalo de

duração do experimento (6 semanas) e o fato dos animais terem se alimentado constantemente sem alguma restrição. Um fator relevante que poderia ter influência no aumento da massa corpórea dos animais, consiste no aumento da massa muscular, especificamente, para os animais dos grupos 3 e 4 (submetidos ao exercício em esteira). Isso se torna possível, pois, esses animais foram submetidos a esforços de intensidade crescente durante os testes realizados para a coleta de amostras de sangue, sem contar no próprio caráter de aumento progressivo na intensidade da corrida envolvida no treinamento proposto, conforme sugerido por Moraska *et al.*, 2000. Entretanto, tal inferência não foi observada nesse estudo.

Por outro lado, o menor ganho na massa corpórea observado no grupo 4 (submetido ao exercício e laser) em relação ao grupo 1 é sugestivo de uma maior atividade metabólica, indicada pela maior atividade enzimática (ex: CS) presente nesse grupo, sendo os AGLs o principal substrato energético envolvido no metabolismo oxidativo desses animais. Isso é verdade, uma vez que o exercício proposto por ter sido de caráter aeróbio, pode ter favorecido ao maior metabolismo da gordura (ácidos graxos) nesses animais comparado aqueles sem atividade física (sedentários), conforme sugerido por outros autores (HOLLOSSZY; COYLE, 1984; MORASKA *et al.*, 2000; ZONDERLAND *et al.*, 1999).

Siu *et al.* (2002); Moraska *et al.* (2000), observaram em seus estudos que ambos os grupos controle e treinado apresentaram aumento de peso corporal após um período de treinamento aeróbio em esteira. No entanto, esse ganho foi estatisticamente menor no grupo submetido ao treinamento em relação ao controle, como observado nesse estudo.

- **Atividade da citrato sintase:**

Os resultados referentes à atividade enzimática da CS evidenciam um maior nível de atividade dessa enzima no músculo cardíaco e no sóleo. Tais resultados eram de se esperar e pode ser relacionado com a concentração tecidual da enzima e, conseqüentemente, com o

perfil metabólico desses tecidos, tendo em vista que se caracterizam por serem predominantemente aeróbios, diferentemente do TA que possui morfologia, fisiologia e bioenergética tipicamente anaeróbia (LIEBER, 1992).

O aumento estatisticamente significativo na atividade enzimática da CS nesses tecidos predominantemente aeróbios, observado, sobretudo, no grupo 4, evidencia o efeito conjunto do exercício e laser de baixa intensidade. Esses estímulos favorecem respostas adaptativas de caráter aeróbio, o que retrata a especificidade da resposta ao tipo de intervenção aplicado (POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

Halsberghe (2003), verificou, através de análises de cinética enzimática da MDH (malato desidrogenase), e da razão LDH/MDH, um aumento em 72% no metabolismo aeróbio do músculo sóleo, imediatamente após um regime de treinamento aeróbio, em ratos submetidos a fotoestimulação por laser na faixa do infravermelho (780 nm), utilizando os mesmos parâmetros dosimétricos considerados nesse estudo.

Beckerman *et al.* (1992); Karu (1987); Kitchen e Partridge (1991); Wilden e Karthein (1998), sugerem que a magnitude ou eficácia do efeito biomodulatório atribuído ao laser de baixa intensidade ao interagir com os tecidos biológicos, é dependente, dentre outros fatores, das condições metabólicas prévias do tecido, de tal forma que a resposta tende ser ótima quando o potencial redox celular se encontra alterado como, por exemplo, num quadro de lesão tecidual, cujo ambiente celular apresenta condições (diminuição do Ph e do suprimento energético - O₂) que favorece a maior interação da radiação com os tecidos, e conseqüentemente, maior resposta biológica final (fotomodulação), diferentemente de quando o ambiente celular encontra-se em condições de normalidade/fisiológicas. Assim, considerando que a resposta foi maior no grupo submetido ao laser mediante exercício físico, provavelmente o “estresse metabólico” proporcionado pelo treinamento pode ter favorecido

para uma maior ação do laser e conseqüentemente maior efetividade da resposta estimulatória por parte do tecido.

Baxter (1997); Kitchen e Bazin (1996); Laakso, Richardson e Cramond (1993a) sugerem que o tipo de laser, e dessa forma, o comprimento de onda utilizado, é um fator determinante dos efeitos fisiológicos, pois determina quais biomoléculas absorverão a radiação. Nesse sentido, tem sido sugerido na literatura especializada (KARU, 1998; ORTIZ; BRASILEIRO, 2004), que o laser na faixa do infravermelho próximo (700-900 nm), o qual foi utilizado nesse estudo (780 nm) apresenta como vantagens em relação ao visível o fato de possuir maior potência de emissão e, conseqüentemente, maior penetração nos tecidos. Isso se dá pelo fato desse tipo de laser ser pouco absorvível pelo componente aquoso e hemoglobina presentes na superfície tecidual. Por outro lado, considerando o aspecto de absorção, é referido que a faixa espectral desde o visível (ex: 632,8 nm) até o infravermelho próximo (WILDEN; KARTHEIN, 1998) é capaz de interagir com moléculas fotoceptoras (componentes da cadeia respiratória mitocondrial), como o NADH-Desidrogenase, Succinato Oxidase e Citocromo C Oxidase (KARU, 1987; PASTORE *et al.*, 1994, QUARTO *et al.*, 1988) que estão diretamente envolvidas no metabolismo oxidativo da célula, e conseqüentemente, desencadear uma resposta fotobiológica final. Uma vez que ocorre essa interação entre laser e cromóforos mitocondriais, uma aceleração no fluxo de elétrons proporcionado por esses cromóforos mediante estímulo da radiação laser de baixa intensidade consiste num provável mecanismo responsável pelos efeitos sobre a bioenergética (ex: aumento na taxa respiratória e síntese de ATP).

Wilden; Karthein (1998), relatam que os componentes da cadeia respiratória funcionam como uma espécie de “antenas ressonadoras” que respondem à radiação luminosa de comprimentos de onda específicos, no sentido de aumentar o fluxo de elétrons, e conseqüentemente vitalizar a célula no aumento do metabolismo energético.

Considerando parâmetros dosimétricos Karu (1987); Yu *et al.* (1997), relatam que baixas doses regulam ou aceleram o transporte de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria, enquanto doses elevadas ocasionam efeitos adversos nos transportadores de elétrons (componentes da cadeia respiratória). Assim, priorizou-se nesse estudo uma dose considerada baixa ($3,8 \text{ j/cm}^2$) a qual, em conjunto com outras variáveis manipuláveis nos aparelhos de laserterapia, pode ter sido satisfatória para a obtenção da resposta de maior atividade da CS, representada, provavelmente, pela maior densidade mitocondrial e conseqüentemente, maior síntese protéica (enzimática). Portanto, acredita-se que exista uma “janela terapêutica” para uma fotoestimulação efetiva acima de um valor limiar, porém abaixo de um valor que ocasione uma fotoinibição.

Também Amaral (2004), investigando a atividade da CS em músculo TA após induzir uma criolesão, verificou um aumento nos índices dessa enzima nos grupos irradiados por laser quando comparado aos grupos controle e placebo, principalmente nos comprimentos de onda no limite do visível e na faixa do infravermelho próximo semelhante ao utilizado em nosso estudo.

O aumento na atividade da CS foi evidente também no grupo submetido ao exercício quando comparado ao grupo controle, principalmente em extratos de músculo cardíaco.

Tonkonogi, Harris e Sahlin (1997), observaram também um aumento na atividade da CS imediatamente após uma sessão de exercício prolongado, evidenciando o efeito agudo do exercício sobre a atividade enzimática.

Moraska *et al.* (2000), sugerem que uma das adaptações do treinamento de *endurance* consiste no aumento da biogênese mitocondrial que pode ser indicada pela maior atividade da CS, uma vez que esta enzima ocupa importante posição na via aeróbia, como observado nesse estudo.

Outros estudos tanto em animais (SIU *et al.*, 2002), quanto em humanos (LEEK *et al.*, 2001), têm evidenciado o aumento na atividade da CS após o exercício em curto prazo (agudo) e em longo prazo (crônico). Porém, esses últimos autores sugerem que o tempo decorrido desde a execução da sessão de exercício até a extração das amostras musculares para a avaliação da atividade enzimática, é um fator crítico na determinação dos resultados referentes à cinética enzimática, sendo, pois, responsável pela discordância de alguns achados sobre essa temática. Tem sido discutido, ainda, que o efeito da sessão aguda pode ser influenciado pelo estágio de treinamento e pelo nível de CS. Porém, apesar de não se conhecer o tempo exato de curso das mudanças na CS, os autores sugerem que o aumento na atividade da enzima ocorra 1 hora após o exercício, permanecendo elevada até 24 horas e retornando para valores basais após um período de tempo de 72 horas.

Assim, tomando-se por base o fato de que as amostras musculares, nesse estudo, foram coletadas dois dias após a realização da última sessão de exercício, o que descartaria a ação direta desta sessão, e pelo fato, do grupo 4 (submetido ao exercício e laser) ter apresentado valor maior de atividade da enzima CS em relação ao grupo 3 (submetido somente ao exercício), tal aumento evidenciaria a ação preponderante do laser de baixa intensidade. Uma outra provável justificativa, além das supracitadas, para o aumento observado na atividade da CS em músculos submetidos à irradiação por laser (ex: músculo sóleo), seria a formação de mitocôndrias atípicas e/ou maiores e, portanto, com maior teor de enzimas do metabolismo aeróbio como sugerido por Bakeeva *et al.* (1993) e Manteifel, Bakeeva e Karu (1997). Também, Greco *et al.* (1991) observaram a formação de mitocôndrias atípicas, bem como, o aumento na atividade enzimática, após a irradiação com laser He-Ne sobre mitocôndrias isoladas de fígado de ratos, sugerindo, assim, que algum mecanismo possa desencadear a biogênese mitocondrial a partir da irradiação por laser. Vacca *et al.* (1996) demonstraram a

capacidade da radiação laser elevar a síntese de proteínas mitocondriais e citosólicas em hepatócitos.

Especificamente sobre o aumento na atividade da CS observado no músculo cardíaco dos animais do grupo 4, tal achado pode refletir o efeito sistêmico desse recurso fisioterapêutico, tendo em vista que esse tecido não foi irradiado diretamente por laser. Porém, não se pode descartar as adaptações sistêmicas e musculares proporcionadas pelo treinamento de *endurance*, representadas pela hipertrofia do coração, e conseqüentemente, maior número e atividade das enzimas oxidativas (BLAIR *et al.*, 1994; MORASKA *et al.*, 2000; POWERS; HOWLEY, 2000; WILMORE; COSTILL, 2001).

Baxter (1997) e Rochkind *et al.* (1989) sugerem que o laser de baixa intensidade gera efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos, não só na área de difusão óptica, mas também, nas regiões circundantes ocasionando manifestações sistêmicas, cuja provável explicação seria o fato do tecido submetido ao laser produzir substâncias que, após a irradiação, vão circular nos vasos sanguíneos e no sistema linfático e dessa forma, ocasionar respostas em outras áreas corporais.

Especificamente sobre os resultados da CS, evidenciados nesse estudo, e sobre os da MDH, encontrados por Halsberghe (2003), decorrentes da ação do laser de baixa intensidade, pode-se especular que tais achados podem, em parte, ter sido ocasionados por modificações físicas (tamanho) e/ou químicas (modulação do potencial redox com aumento no fluxo de elétrons pelos componentes da cadeia respiratória) da mitocôndria como sugerido por outros autores (BAKEEVA *et al.*, 1993; KARU, 1987; 1999; MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997; PASTORE *et al.*, 1994).

- **Atividade da lactato desidrogenase:**

O sistema isozímico da LDH se constitui no mais estudado na maioria dos vertebrados, pois é considerado um dos melhores meios para estudos de ajustes metabólicos a variações nos parâmetros externos ou internos das espécies (GOMES, 2002).

Numa visão geral, pode-se observar que para essa enzima os músculos sóleo e cardíaco apresentaram comportamentos semelhantes, no que se refere ao padrão de atividade entre os grupos. Tal achado parece estar relacionado com as características fisiológicas desses tecidos (perfil metabólico), de modo que aqueles apresentam características de metabolismo aeróbio diferentemente do TA que é predominantemente anaeróbio, como já referido. Além disso, esses músculos predominantemente aeróbios exibiram níveis de LDH menores do que o músculo TA. Isso pode retratar, não só o perfil metabólico do tecido, mas também, a especificidade da resposta adaptativa ao tipo de estímulo proposto. Assim, como o TA possui metabolismo predominantemente anaeróbio e a LDH é uma enzima chave desse tipo de metabolismo, já era de se esperar uma maior atividade nesse tecido.

Considerando-se as atividades da LDH entre os grupos, pode-se observar uma menor atividade da LDH (maior inibição) nos grupos submetidos ao laser quando comparada a de seus respectivos controles, com exceção do TA do grupo 4, que sofre uma ativação de 103%. Para o músculo TA, apesar de todos os grupos apresentarem uma menor atividade da enzima (inibição) em relação ao grupo 1 (controle), como já esperado, tendo em vista os estímulos propostos (exercício e/ou laser) visarem respostas aeróbias, em detrimento de respostas anaeróbias, houve uma menor redução (27%) na atividade da LDH no grupo submetido ao exercício e laser. Isso pode estar relacionado com o grande número de repetições apresentado pelos animais desse grupo durante os testes de esforço para a determinação do LA. Esses testes exigiam um grande esforço do animal e conseqüentemente, um aumento da atividade anaeróbia o que pode ter contribuído para esse resultado.

Corroborando tal hipótese, Dudley, Abraham e Terjung (1982), investigando a influência da duração e intensidade do exercício sobre adaptações bioquímicas do músculo esquelético, evidenciaram um maior estresse metabólico e, portanto, aumentada taxa glicolítica, durante as maiores velocidades de corrida, atribuindo tal achado ao maior número de contrações musculares requeridas, principalmente pelas fibras tipo IIb. Isso por sua vez, pode justificar o aumento na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo anaeróbio, como a LDH aqui estudada.

Um outro fato observado consistiu na semelhança no padrão de atividade da LDH nas concentrações de 1 mM e 10 mM, indicando a confiabilidade e homogeneidade da análise realizada para essa enzima.

- **Razões de atividade B/A e padrões eletroforéticos da LDH**

Segundo Bailey e Wilson (1968), a razão entre a atividade enzimática da LDH em baixas concentrações de piruvato ($3,3 \times 10^{-4}$ M) e altas concentrações (1×10^{-2} M), denominada B/A, pode indicar homologias entre isoformas ortólogas (codificadas em loci, originalmente os mesmos que foram separados por especiação). Essa relação tem sido, freqüentemente, utilizada por diversos autores com a mesma concentração inibitória, porém com a baixa concentração diferente (1×10^{-3} M) (ALMEIDA-VAL, 1986). A razão de atividade B/A pode fornecer uma idéia do tipo de subunidade predominante em cada tecido, uma vez que a isoforma predominante em músculo esquelético de característica anaeróbia (A_4 – LDH tipo muscular), possui pouca inibição em altas concentrações de substrato quando comparada à predominante em músculo cardíaco (B_4 – LDH tipo cardíaco) que é fortemente inibida nessas concentrações. As relações obtidas no presente trabalho sugerem um predomínio da subunidade B nos 3 músculos analisados, tendo em vista terem se mostrado maiores que um, principalmente, para os músculos sóleo e cardíaco (1,8 à 2,4) como era de se

esperar, o que impediria o acúmulo de lactato nesses tecidos. Tal achado é corroborado tanto pelo maior percentual de inibição à concentração de 10mM de substrato (44% à 57% em sóleo e 44% à 58% em coração) quanto pelo predomínio da subunidade B, obtido através do método de diluições seriadas de Klebe (1975) (1,4B : 1A à 1,7B : 1A), nesses tecidos com características aeróbias. Assim, os ratos analisados retêm a predominância da subunidade cardíaca mesmo em TA, considerado anaeróbio. Porém, apesar das relações B/A indicarem um predomínio (1,4 à 1,7) e inibições menores (29% à 40%) da subunidade B também para o músculo TA (músculo branco e glicolítico) e na eletroforese a subunidade A só ser detectada na forma de heteropolímeros, a predominância da subunidade B não se mostrou evidente pelo método de Klebe (1975). Foi detectado através desse método predomínio da subunidade A (1B : 1,2A à 1B : 1,7A), como já era de se esperar. Essa expressão divergente dos loci da LDH nos diferentes tecidos já era esperada, uma vez que o músculo TA, onde houve um ligeiro predomínio do tipo de subunidade muscular, é um músculo esquelético de contração rápida, predominantemente de fibras brancas, que apresenta, pois, baixa taxa oxidativa e alta taxa glicolítica.

O aumento no produto do locus *LDH-A** em determinado tecido pode estar relacionado a diferentes fatores, em destaque, o aumento da atividade glicolítica do tecido durante períodos de anaerobiose causada por uma diminuição da oferta de oxigênio no ambiente ou por um “estresse metabólico” decorrente de demandas energéticas maiores do organismo como no caso de um esforço intenso. Assim, o aumento de 3% de subunidades A observado no músculo TA dos animais do grupo 4, de 4% no sóleo do grupo 3 e de 10% no coração do grupo 3, pode ter relação com a grande demanda energética a que esses animais foram submetidos como já referido, principalmente, durante os testes de esforço crescente. O aumento de 8% detectado no sóleo do grupo 2 só pode ser decorrente da irradiação a que esse grupo foi submetido. Por outro lado, nos músculos sóleo e cardíaco, onde predominou o tipo

de subunidade cardíaca, ocorrem, predominantemente, fibras vermelhas e conseqüentemente, altas taxas oxidativas e baixas glicolíticas (LIEBER, 1992). Entretanto, é necessário ressaltar um provável padrão regulatório complexo para as isoformas da LDH dado pela restrição de expressão do locus *LDH-A** nesses ratos.

- **Razões de atividade LDH/CS**

Para determinar as propriedades metabólicas, utilizamos o paradigma de diferenciação metabólica proposto por Pette e Spamer (1986). Esse modelo assume que a diferenciação metabólica no músculo estriado está relacionada às capacidades relativas de rotas aeróbias e anaeróbias e que a medida das atividades de enzimas oxidativas e glicolíticas se constituem em medidas das capacidades dessas rotas. Além disso, o modelo emprega a relação de atividades enzimáticas de rotas metabólicas aeróbias e anaeróbias para distinguir entre músculos com diferentes características metabólicas. As atividades da CS e da LDH foram escolhidas, nesse estudo, como marcadores de rotas aeróbias e anaeróbias, respectivamente. O predomínio no metabolismo aeróbio observado no músculo cardíaco dos grupos 2, 3 e 4, tendo em vista que todos os valores se mostraram inferior a um (0,24, 0,28 e 0,09), era esperado uma vez que esse tecido apresenta alta capacidade oxidativa, em decorrência da grande quantidade de enzimas mitocondriais que possui (POWERS; HOWLEY, 2000; SIU *et al.*, 2003; WILMORE; COSTTIL, 2001). Esse aumento foi evidenciado principalmente no grupo 4 (submetido ao exercício e laser), o que pode ser indicativo da resposta ao treinamento como relatado por outros autores (SIU *et al.*, 2003) associada a maior efetividade do laser de baixa intensidade. Essa maior atividade metabólica sugerida para o grupo 4 é justificada não só pela realização do exercício proposto, mas também pelo menor ganho de peso corporal observado nesse grupo após o período experimental, como já referido. Este fato estar de acordo com Moraska *et al.* (2000), os quais sugeriram que dentre as adaptações já citadas referentes ao treinamento de

endurance pode-se destacar também o aumento na taxa metabólica indicada pela redução no ganho do peso corporal após um período de treinamento, como encontrado nesse estudo.

- **Limiar de anaerobiose:**

Os achados referentes às adaptações fisiológicas relativas ao LA encontrados nesse estudo sugerem, primeiramente, que a determinação do LA em ratos sob treinamento aeróbio em esteira e submetidos a esforços de intensidade progressiva ocorre de maneira similar às descritas em humanos, conforme encontrado por Pilis *et al.*, 1993. Isso possibilita aos profissionais envolvidos, sobretudo, no esporte, a determinação com maior acurácia da intensidade do esforço em que o lactato sérico começa a se acumular, de modo a facilitar para a melhor avaliação da performance do indivíduo e prescrição de uma determinada atividade física.

O aumento na velocidade máxima da corrida, o desvio do LA para um nível de maior esforço e a ligeira tendência na redução do lactato sérico, para uma mesma carga de trabalho, encontrados nesse estudo ao final das cinco semanas de treinamento podem representar adaptações fisiológicas, em especial musculares, ao treinamento aeróbio. Essas adaptações são traduzidas pelo aumento na capacidade oxidativa, em decorrência do maior conteúdo mitocondrial em tecidos como músculo esquelético, coração e fígado, que pode ser evidenciado pela maior atividade da CS e conseqüentemente, pela maior oferta de O₂ para síntese de ATP. Outro fator envolvido consiste na maior capacidade de gliconeogênese conforme sugerido por outros estudos (BROOKS, 1998; GLADDEN, 2000; HATTA, 1990; SPRIET; HOWLETT; HEIGENHAUSER, 2000).

Hollosszy e Coyle (1984), sugerem que a principal conseqüência metabólica do treinamento aeróbio é o aumento na densidade mitocondrial que favorece um maior tempo de corrida e um aumento da atividade aeróbia em cargas maiores. Outra adaptação consiste na

redução da velocidade de utilização do glicogênio muscular e, por conseguinte, aumento na capacidade do músculo em oxidar AGLs. Isso, por sua vez, contribuirá para a menor produção de lactato durante o exercício numa determinada velocidade.

Assim, tem sido sugerido na literatura científica que o acúmulo de lactato no sangue, para uma mesma carga de trabalho, é reduzido após um período de treinamento de *endurance* tanto nos estudos em animais quanto em humano, cujas explicações para tal benefício, em linhas gerais, tem sido atribuídas ao aumento na capacidade oxidativa, a redução na produção de lactato e ao aumento na taxa de sua remoção (BROOKS, 1998; GLADDEN, 2000; MCDERMOTT; BONEN, 1993; SPRIET; HOWLETT; HEIGENHAUSER, 2000).

Especificamente, sobre a remoção de lactato, esta pode ocorrer, após um programa de treinamento, pela ocorrência de fatores como: o aumento da gliconeogênese por parte do músculo esquelético e dos hepatócitos, como já citado; a utilização do lactato pela contração de fibras oxidativas (tipos I e IIa); e o eficiente transporte de lactato através da membrana sarcolemal (FAVIER *et al. apud* MCDERMOTT; BONEN, 1993; GLADDEN, 2000; POWERS; HOWLEY, 2000). Além disso, o exercício pode aumentar o transporte de lactato via ativação de proteínas da membrana sarcolemal (BROOKS, 1998) e da atividade enzimática (DOHM; KASPEREK; BAKARAT, 1985), de modo a contribuir no aumento do caminho gliconeogênico do lactato. Porém, não se evidenciou diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos no que se refere a velocidade máxima da corrida e velocidade da corrida no momento do LA.

Foi possível identificar ainda que o LA ocorreu numa porcentagem em torno de 70-80% da velocidade máxima para ambos os grupos. Segundo Powers e Howley (2000), o LA em indivíduos treinados se dá numa porcentagem maior que naqueles sedentários, ocorrendo entre 65-80% da carga máxima, como encontrado nesse estudo. Corroborando esse achado,

Pilis *et al.* (1993), verificaram o LA em ratos sedentários em torno de 55-65%, evidenciando a obtenção do LA numa carga de trabalho menor que nos indivíduos treinados.

Esse estudo sugere que a radiação laser de baixa intensidade possa influenciar variáveis bioquímicas, como a atividade enzimática da CS e LDH, em tecidos como o músculo esquelético (ex: sóleo) e cardíaco, no sentido de estimular o metabolismo celular aeróbio. Considerando as modificações significantes na atividade enzimática, principalmente da CS, para o grupo submetido ao exercício e laser de baixa intensidade em relação aos grupos controles, era de se esperar a obtenção de uma melhor performance, principalmente quando associado ao exercício físico (estresse metabólico), fato este, não observado no presente estudo. Porém, é pertinente considerar, baseado nos achados referentes a velocidade máxima e velocidade no momento do LA exibido pelos animais dos grupos 3 e 4, que o primeiro grupo tendeu a apresentar uma estabilização dos parâmetros (ganho aeróbio) em torno da quarta avaliação, diferentemente do segundo (grupo 4) que apresentou valores superiores dessas variáveis durante a última avaliação, exibindo assim, uma curva ascendente. Assim, os resultados encontrados nesse estudo ficam limitados a alguns questionamentos: Porque se evidenciou uma diferença na atividade enzimática, mas não na performance do exercício máximo? Se o protocolo de treinamento fosse realizado por um período maior de tempo os resultados se estabilizariam a partir de qual semana?

Os comentários supracitados não passam de hipóteses não respondidas nesse trabalho e servem de justificativa para a continuidade dessa investigação. Portanto, um maior número de estudos devidamente controlados envolvendo esse recurso ainda são necessários no sentido de contribuir para a obtenção de uma melhor fundamentação científica acerca de seus reais efeitos fisiológicos, em destaque os relacionados a bioenergética, e do seu uso como modalidade terapêutica eficaz e segura. Isso é verdade, tendo em vista que a correta aplicação, considerando a determinação dos parâmetros manipuláveis nos aparelhos de laser e

conseqüentemente seus efeitos fisiológicos, são situações de grande incômodo, na maioria das vezes, para o profissional fisioterapeuta no âmbito da prática clínica.

6 – CONCLUSÕES

Houve ativação da CS e inibição da LDH provocadas pelo laser (G2), exercício (G3) e suas ações combinadas (G4), em relação ao G1, para todos os extratos teciduais, com exceção do sóleo do G2, no qual ocorreu inibição de ambas as enzimas; bem como, do G4, em relação ao G3, com exceção do TA, no qual houve ativação das duas enzimas;

Evidenciou-se aumento na atividade da CS e diminuição na da LDH no coração, sugerindo uma forte ação sistêmica da radiação laser, tendo em vista que esse tecido não foi irradiado;

Observou-se um predomínio da subunidade B para todos os extratos teciduais dos 4 grupos estudados verificado através das razões B/A e padrões eletroforéticos. Por consequência, isso indicaria que os ratos aqui analisados retêm a predominância da subunidade cardíaca mesmo em TA, considerado anaeróbio. Entretanto, através do método de diluições seriadas de Klebe (1975) foi possível identificar um predomínio da subunidade A em extratos de TA;

As razões LDH / CS evidenciaram um predomínio do metabolismo aeróbio no coração e do anaeróbio no sóleo (com exceção do grupo 4) e TA, para todos os grupos experimentais. Em relação ao grupo 1, essas razões evidenciaram aumentos no metabolismo aeróbio de 2% à 78% provocados pelo laser; de 18% à 75% pelo exercício; e de 43% à 92% pelas ações combinadas. Em relação ao grupo 3, os valores detectados no grupo 4, indicaram aumentos do metabolismo aeróbio em coração e sóleo e, do anaeróbio no TA, devido somente ao laser na presença do exercício;

A radiação laser se mostrou efetiva para influenciar as atividades das enzimas CS e LDH e alterar o metabolismo, mas não no limiar de anaerobiose e na velocidade máxima;

O modelo de treinamento aeróbio em esteira utilizando animais de experimentação permitiu a determinação do LA, cujas adaptações fisiológicas tendem a ocorrer de maneira semelhante às encontradas em humanos;

Foi possível identificar, após o período de treinamento, um aumento na velocidade máxima e um desvio do LA para um nível de maior esforço nos animais de ambos os grupos submetidos ao exercício. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para essas variáveis;

Modelos em animais tornam-se importantes como forma de contribuir para elucidação dos mecanismos fisiológicos do LA, e conseqüentemente, facilitar a avaliação e prescrição de uma atividade física. Além disso, pesquisas envolvendo o laser de baixa intensidade sobre indicadores metabólicos se fazem necessárias, tendo em vista a sua ação sobre essas variáveis, em destaque, a atividade de enzimas chaves nas vias metabólicas e suas relações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-VAL, V. M. F. Lactato desidrogenase de duas espécies de peixes da Amazônia, *Mylossoma duriventris* e *Colossoma macropomum* (Characiformes): Aspectos adaptativos. Manaus, 1986. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; FARIAS, L. P.; PAULA-SILVA, M. N.; DUNCAM, W. P. Biochemical adjustments to hypoxia in amazon cichlids. **Braz. J. Med. Biochem. Res.**, v.28, p.1257-1263, 1995.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médica, 1997.

AMARAL, A. C. **Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (*in vitro*) e durante a regeneração muscular (*in vivo*)**. São Carlos, 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos.

AMESTOY, R. D. F. Fundamentos de laserterapia. **Acupuntura**, v. 3, p.17-23, 1995.
BAILEY, G. S.; WILSON, A. C. Homologies between isoqymes of fishes and those higher vertebrates. Evidence for multiple H₄ lactate dehydrogenase in trout. **J. Biol. Chem.**, 243, p. 5843-5953.

APELLA, E.; MARKERT, C. L. Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride. **Biochem. Biophys. Comm.**, v. 6, p. 171-176, 1961.

BAKEEVA, L. E.; MANTEIFEL, V. M.; RODICHEN, E. B; KARU, T. Formation of giant mitochondria in human blood lymphocytes after He-Ne laser irradiation. **Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 608-617, 1993.

BALOGH, N.; GAÁL, T.; RIBICZEYNÉ, P. Sz.; PETRI, Á. Biochemical and Antioxidant Changes in Plasma and Erythrocytes of Pentathlon Horses Before and After Exercise. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, p. 214-217, 2001.

BAILEY, G. S.; WILSON, A. C. Homologies between isoenzymes of fishes and those of higher vertebrates. **J. biol. Chem.**, v. 243, n. 22, p. 5843-5853, 1968

BASFORD, J. R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, p. 1-5, 1989.

BAXTER, G. D.; BELL, A. J.; ALLEN, J. M.; RAVEY, J. Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-178, 1991.

BAXTER, G. D. Bioenergetics and tissue optics. In: _____. **Therapeutic lasers: theory and practice**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1994.

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: Ed. Churchill Livingstone, 1997.

BECKERMAN, H.; DE BIE, R.; BOUTER, L.; DE CUYPER, H.; OOSTENDORP, R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, v. 72, p. 483-491, 1992.

BERGERON, R.; REN, J.M.; CADMAN, K.S.; MOORE, I.K.; PERRET, P.; PYPART, M.; YOUNG, L.H.; SEMENKOVICH, C.F.; SHULMAN, G.I. Chronic activation of AMP kinase results in NRF1 activation and mitochondrial biogenesis. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 281, p. E1340-E1346, 2001.

BLAIR, S. N.; PAINTER, P.; PATE, R. R.; SMITH, L. K.; TAYLOR, C. B. **Prova de esforço e prescrição de exercício**. Rio de Janeiro: Revinter, 1994.

BONEN, A.; HOMONKO, D. A. Effects of exercise and glycogen depletion on glyconeogenesis in muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 76, p. 1753-1758, 1994.

BOYER, S. R.; FAINER, D. C.; WASON-WILLIAMS, E. S. Lactate dehydrogenase variante from human blood. Evidence for molecular subunits. **Science**, v. 141, p. 642-643, 1963.

BROOKS, G. A. Intra and extra cellular lactato shuttles. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 4, p. 790-799, 1998.

CAMPO, M. L.; BOWMAN, C. L.; TEDESCHI, H. Assay of ATP síntesis using single giant mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, v. 141, p. 1-4, 1984.

CHEN, Z. P.; MCCONELL, G. K.; MITCHELL, B. J.; SNOW, R. J.; CANNY, B. J.; DEMP, B. E. AMP signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 279, p. E1202-E1206, 2000.

CONLEY, E. K.; KEMPER, W. F.; CROWTHER, G. J. Limits to sustainable muscle performance: interaction between glycolysis and oxidative phosphorylation. **The Journal of Experimental Biology**, v.204, p.3189-3194, 2001.

DE BIE, R. A.; DE VET, H.; LENSSEN, T. F.; WILDENBERG, F.; KOOTSTRA, G. Low-level laser therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. **Arch. Phys. Méd. Rehabil.** v.79, p.1415-1420, 1998.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1998.

DOHM, G. L.; KASPEREK, G. J.; BAKARAT, H. A. Time course of changes in gluconeogenic enzyme activities during exercise and recovery. **Am. J. Physiol.**, v. 249, E6-E11, 1985.

DRIEDZIC, W. R.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Matching of cardiac oxygen delivery and fuel supply to energy demand in teleosts and cephalopode. **Can. J. Zool.**, v. 66, p. 1078-1083, 1996.

DUDLEY, G. A.; ABRAHAM, W. M.; TERJUNG, R. L. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v.53, n. 4, p. 844-850, 1982.

FERRIS, S. D.; WHITT, G. S. Evolution of the differential regulation of the duplicate genes after polyploidization. **J. Mol. Evol.**, v.12, p. 267-317, 1979.

FOSS, M. L.; KETAYIAN, S. J. **Bases Fisiológicas da Educação Física e dos Desportos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

FRIEDMAN, H.; LUBART, R.; LAULICHT, I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 11, p.87-95, 1991.

GLADDEN, L. B. Muscle as a consumer of lactate. **Med. Sci. Sport. Exerc.**, v. 32, n. 34, p. 764-771, 2000.

GOMES, A. R. C. **Adaptações metabólicas dos ciclídeos aos ambientes hipóxicos da Amazônia**. Manaus, 2002. 151 f. Tese (doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas.

GRECO, M.; PERLINO, E.; PASTORE, D.; GUIDA, G.; MARRA, E.; QUAGLIARIELLO, E. Helium-neon laser irradiation of rat liver mitochondria gives rise to a new subpopulation of mitochondria: isolation and first biochemical characterization. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 10, p. 71-78, 1991.

HALSBERGHE, M.J.E. **Estudo de Indicadores de Taxas de Metabolismo Aeróbio e Anaeróbio em Musculatura de Ratos em Resposta à Irradiação com Laser em Baixa Intensidade.** São Carlos, 2003. 56 f. Monografia (Bacharelado em Biologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos.

HATTA, H. Oxidative Removal of Lactate after Strenuous Exercise. **Ann. Physiol. Anthropol.**, v. 9, n. 2, p. 213-218, 1990.

HOCHACHKA, P. W.; STOREY, K. B. Metabolic consequences of diving in animals and man. **Science.** v. 187, p. 613-621, 1975.

HOFFMAN-GOEZ, L.; PEDERSON, B. K. Exercise and the immune system: a model of the stress response. **Immunology today**, v. 15, p.382-387, 1994.

HOLLOSZY, J. O.; COYLE, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **J. Appl. Physiol.**, v. 56, p. 831-838, 1984.

HOOD, D. A. Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 1137-1157, 2001.

HOWLETT, R. A.; PAROLIN, M. L.; DYCK, D. J.; HULTMAN, E.; JONES, N. L.; HEINGENHAUSER, G. J.; SPRIET, L. L. Regulation of skeletal muscle glycogen phosphorylase and pyruvate dehydrogenase at varying exercise power outputs. **Am. J. Physiol.**, v. 275, R418-R425, 1998.

KAINULAINEN, H.; KOMULAINEN, J.; TAKALA, T.; VIHKO, V. Effect of chronic exercise on glucose uptake and activities of glycolytic enzymes measured regionally in rat heart. **Basic. Res. Cardiol**, v. 84, p. 174-190, 1989.

KALCKAR, H. 1947 J. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. **J. Biol. Chem.**, v.167. p. 429-459, 1947.

KARU, T. I. **The science of Low-Power Laser Therapy.** Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.

KARU, T. I. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: KARU, T.I. & LUBART, R. **Effects of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v.4159, p. 01-17, 2000.

KARU, T. I. Photobiological fundaments of low-power laser therapy. **IEEE Journal of Quantum electronics QE**, v. 23, n. 10, p. 1703-1717, 1987.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiatiion on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, p.1-17, 1999.

KARU, T. I. **Photobiology of low-power laser therapy**. London: Harwood Academic Phblishers, 1989.

KARU, T.; TIPHLOVA, O.; ESENALIEV, R.; LETOKHOV, V. Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 24, p.155-161, 1994.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, p.219-223, 1995.

KATZ, A.; SAHLIN, K. Regulation of lactic acid production during exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 65, p. 509-518, 1988.

KIBERSTIS, P. A. Mitochondria make a comeback. **Science**, v. 283, p. 1475-1482, 1999.

KITCHEN, S. S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Ed. Manole Ltda, p. 191-210, 1996.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. A review of level laser therapy. Part I: background, physiological effects and hazards. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161-170, 1991.

KLEBE, R. J. A simple method for the quantitaion of isozyme patterns. **Biochem. Gen.**, v.11/12, p. 805-812, 1975.

LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Quality of light – is laser necessary for effective photobiostimulation ?. **Australian J. Physiotherapy**, v. 39, n. 2, p. 87-92, 1993.

LANGFORT, J.; ZARZECZNY, R.; PILIS, W.; KACIUBA-USCIEKO, H.; NAZAR, K.; PORTA, S. Effect of Sustained Hyperadrenalinemia on Exercise Performance and Lactate Threshold in Rats. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 114a, n. 1, p. 51-55, 1996.

LEEK, B. T.; MUDALIAR, S. R. D.; HENRY, R.; MATHIEU-COSTELLO, O.; RICHARDSON, R. S. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative. Comp. Physiol.**, v. 280, R. 441-R447, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIEBER, R. L. **Skeletal Muscle Structure and Function. Implications for Rehabilitation and Sportes Medicine**. Maryland, USA. Williams & Wilkins, 1992.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**. 3. ed. Barueri-SP: Manole, 2001.

MAESTRONI, G.; CONTI, A.; POERPAOLI, W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the immunosuppressive effect of corticosterone. **J. Neuroimmunol.**, v. 13, p. 19-30, 1986.

MAILER, K. Superoxide radical as electron donor for oxidative phosphorylation of ADP. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 170, p.59-64, 1990.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 38, p. 25-30, 1997.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício: Energia, nutrição e desempenho humano**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

MCDERMOTT, J. C.; BONEN, A. Endurance training increases skeletal muscle lactate transport. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 147, p. 323-327, 1993.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine.**, v. 5, p. 31-39, 1985.

MOLINARI, C. V.; SANTOS, A. A. L. **Ação do laser de baixa intensidade sobre musculatura de ratos em treinamento aeróbio.** São Carlos, 2001. Monografia (Graduação em Fisioterapia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos.

MORASKA, A.; DEAK, T.; SPENCER, R. L.; ROTH, D.; FLESHNER, M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative. Comp. Physiol.**, v. 279, R.1321-R1329, 2000.

MORIMOTO, Y.; ARAI, T.; KIKUCHI, M.; NAKAJIMA, S.; NAKAMURA, H. Effect of Low-intensity Argon Laser Irradiation on Mitochondrial Respiration. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 15, p. 191-199, 1994.

NEVO, E. Molecular evolutionary genetics of isozymes: Pattern, theory, and application. **Biol. Med.**, p. 701-742, 1990.

NEWSHOLME, E.; LEECH, A. **Biochemistry for the Medical Sciences.** New York: Wiley and Sons, 1988.

ORTIZ, M. C. S.; BRASILEIRO, J. S. Aplicações dos recursos eletrotermofototerápicos em idosos. In: REBELATO, J.R.; MORELLI, J.G.S. **Fisioterapia geriátrica: a prática da assistência ao idoso.** Barueri: Manole, 2004. p. 167-214.

ORTIZ, M. C. S.; CARRINHO, P. M.; SANTOS, A. A. S.; GONÇALVES, R. C.; PARIZOTTO, N. A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 1, p. 221-240, 2001.

PASSARELLA, S.; OSTUNI, A.; ATLANTE, A.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 156, n. 2, p. 978-986, 1988.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium neon laser. **FEBS**, v. 175, n.1, p. 95-99, 1984.

PASTORE, D.; DI MARTINHO, C.; BOSCO, G.; PASSARELLA, S. Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochemisry and Molecular Biology International**, v. 39, n. 1, p. 149-157, 1996.

PASTORE, D.; GRECO, M.; PETRAGALLO, V. A.; PASSARELLA, S. Increase in H^+/e^- ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochemisry and Molecular Biology International**, v. 34, n. 4, p. 817-826, 1994.

PETER, D.; SPAMER, C. Metabolic properties of muscle fibers. **Fed. Proc.**, v.45, p. 2910-2914, 1986.

PILIS, W; ZARZECZNY, R; LANGFORT, J; KACIUBA-USCIEKO, H; NAZAR, K; WOJTYNA, J. Anaerobic Threshold in Rats. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106a, n 2, p. 285-289, 1993.

POWERS, S. K.; DEMIREL, H. A.; COOMBES, J. S.; CALLIAUD, L. F. C. VRABAS, I.; PREZANT, D. Myosin phenotype and bioenergetic characteristics of rat respiratory muscles. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. v. 29, n. 12, p. 1573-1579, 1997.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2000.

QUARTO, E.; MARTINO, G.; MICHELINI, G.; COVELLO, C.; QUARTLE, I. J. Succinic oxydase activity in He-Ne laser irradiated mitochondria. **Boll. Soc. Int. Biol. Sper.**, v. 64, p.129-133, 1988.

ROCHKIND, S; ROUSSO, M; NISSAN, M; VILLARREAL, M; BARR-NEA, L; REES, D. G. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, p.336-340, 1989.

SALET, C.; PASSARELA, S.; QUAGLIARIELLO, E. Effect of selective irradiation on mammalian mitochondria. **Photochem. Photobiol.**, v. 45, p.433-438, 1987.

SCHAFFER M.; SROKA, R.; SCHRADER-REICHARDT, U.; SCHAFFER, P. M. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, p. 253-357, 1997.

SHAW, C. R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. **Biochem. Genet.**, v. 4, p. 297-320, 1970.

SIU, P. M.; DONLEY, D. A.; BRYNER, R. W; ALWAY, S. E. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. **J. Appl. Physiol**, v. 94, p. 555-560, 2003.

SMITHIES, L.L. An improved procedure for starch gel electrophoresis. Further variations in the serum proteins of normal individual. **Biochem. J.**, v. 71, p. 585-587, 1955.

SPRIET, L. L.; HOWLETT, R. A.; HEIGENHAUSER, G. J. F. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. **Med. Sci. Sport. Exer.**, v.32, p.756-63, 2000.

TONKONOGLI, M.; HARRIS, B.; SAHLIN, K. Increased activity of citrate synthase in human skeletal muscle after a single bout of prolonged exercise. **Acta Physiol. Scand.**, v.161, p.435-436, 1997.

TUNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy**. Clinical practice and scientific background, Sweden: Prima Books, 1999.

VACCA, R. A.; MARRA, E.; QUAGLIARIELLO, E.; GRECCO, M. Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser irradiation. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 195, p. 704-709, 1993.

VAL, A. L.; SCHWANTES, A. L.; SCHWANTES, M. L. B; DE LUCA, P.H. Amido hidrolisado de milho como suporte eletroforético. **Ciência e cultura**, v. 33, p.992-996, 1981.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1389-94, 2002.

WASSERMAN, K. The anaerobic threshold measurement to evaluate exercise performance. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 129 (suppl.):S35-S40, 1984.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, n. 3, p. 159-165, 1998.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

WINDER, W. W.; HARDIE, D. G. Inactivation of acetyl-CoA-carboxylase and activation of AMP-activate protein kinase in muscle during exercise. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 270, p. E299-E304, 1994.

WINDER, W. W.; HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 277, p. E1-E10, 1999.

WINDER, W. W.; HARDIE, D. G.; RUBINK, D. S.; JENSEN, E. B.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J. O. Activation of AMP-activate protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 6, p. 2219-2226, 2000.

YU, W.; NAIM, J. O.; MCGOWAN, M.; KIPPOLITO, K.; LANZAFAME, R. J. Photomodulation of Oxidative Metabolism and Electron Chain Enzymes in Rat Liver Mitochondria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 66, n. 6, p. 866-871, 1997.

ZONDERLAND, M. L.; BAR, P. R.; BEIJNEVELD, J. C.; SPRUIJT, B. M.; KEIZER, H. A.; GLATZ, J. F. C. Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 79, p. 391-395, 1999.

ANEXOS

ANEXO A - Protocolo de treinamento aeróbio

Dias	Duração (min)	Velocidade (m/min)
1 (Domingo)	10	17,5
2	Meta para o 5º dia: Tempo: 18 min Velocidade: 21 m/min	
3		
4		
5		
6 (Sexta-feira)		
7 (Sábado)	DESCANSO	
8 (Domingo)	Meta para o 12º dia: Tempo: 30 min Velocidade: 25 m/min	
9		
10		
11		
12		
13 (Sexta-feira)	TESTE DE ESFORÇO - COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	
14 (Sábado)	DESCANSO	
15 (Domingo)	Meta para o 19º dia: Tempo: 40 min Velocidade: 27,5 m/min	
16		
17		
18		
19		
20 (Sexta-feira)	TESTE DE ESFORÇO - COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	
21 (Sábado)	DESCANSO	
22 (Domingo)	Meta para o 26º dia: Tempo: 50 min Velocidade: 29 m/min	
23		
24		
25		
26		
27 (Sexta-feira)	TESTE DE ESFORÇO - COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	
28 (Sábado)	DESCANSO	
29 (Domingo)	Meta para o 33º dia: Tempo: 60 min Velocidade: 30,5 m/min	
30		
31		
32		
33		
34 (Sexta-feira)	TESTE DE ESFORÇO - COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	
37 (Segunda)	SACRIFÍCIO E COLETA DE AMOSTRAS MÚSCULARES	

