AMANDA SILVEIRA DENADAI

ANÁLISE DOS EFEITOS AGUDOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (660NM) SOBRE OS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS DIABÉTICOS COM FERIDAS NA PELE

Campo Grande
2013

AMANDA SILVEIRA DENADAI

ANÁLISE DOS EFEITOS AGUDOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (660NM) SOBRE OS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS DIABÉTICOS COM FERIDAS NA PELE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

Campo Grande-MS
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA SILVEIRA DENADAI

ANÁLISE DOS EFEITOS AGUDOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (660NM) SOBRE OS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS DIABÉTICOS COM FERIDAS NA PELE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado_____

Campo Grande (MS), ___ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

_____
Profa. Dra. Iandara Schettert Silva
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

_____
Profa. Dra. Suzi Rosa Miziara Barbosa
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

_____
Prof. Dr. Silvio Assis de Oliveira Junior
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

_____
Prof. Dr. Charles Taciro
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

DEDICATÓRIA

"*Um anjo do céu, que trouxe pra mim, é a mais bonita a jóia perfeita, que é pra eu cuidar, que pra eu amar, gota cristalina, tem toda inocência...*" Dedico ao meu filho **João Marcio** que por muitas vezes teve que suportar minha ausência em sua criação. Obrigado meu filho por dar luz a minha vida. Mamãe te ama muito!!!!!

Dedico também meu esposo **João Paulo** pela compreensão, apoio e companherismo a mim dedicado durante esses anos. Tenho certeza que valeu a pena....

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela saúde e capacidade de desenvolver esse trabalho.

À minha mãe **Sandra** pela criação e ensinamentos a mim oferecidos. Por você sou a pessoa que sou hoje.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos** pelos conhecimentos científicos, e por me abrir portas no campo da pesquisa.

À **Profa. Dra. Iandara Schettert Silva**, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível. Minha sincera admiração e respeito à vc.

Ao **Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho** pela ajuda na confecção e revisão do artigo científico. Sua colaboração foi essencial para a conclusão desta jornada.

Aos amigos **Prof. Dr. Petr Melnikov, Anderson Fernandes da Silva, Pedro Carvalho Cassiano, Larissa Olmedo, Bruno Senna, Arianne Tiemi** cada um com a sua ajuda tornou capaz a finalização deste.

Aos profissionais do **Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste e do Biotério Central da UFMS** pelo acolhimento e auxílio.

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança."

(Albert Einstein)

RESUMO

Denadai AS. Análise dos efeitos agudos do laser de baixa intensidade (660nm) sobre os níveis de estresse oxidativo de ratos diabéticos com feridas na pele. Campo Grande; 2013. [Tese – Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Introdução: O termo estresse oxidativo é utilizado quando se evidencia um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes. A laserterapia influencia parâmetros de estresse oxidativo como a alteração da atividade das enzimas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). **Objetivo:** Analisar o efeito da laserterapia de baixa intensidade - LLLT sobre o estresse oxidativo provocado por ferida cirúrgica aguda em ratos diabéticos. **Materiais e métodos:** o experimento foi composto por 36 animais, divididos em quatro grupos com nove animais cada. Grupo NDNI não-diabéticos, com ferida cutânea e sem laserterapia, Grupo NDI animais não-diabéticos, com ferida cutânea e com laserterapia, Grupo DNI diabéticos, com ferida cutânea e sem laserterapia, Grupo DI diabéticos, com ferida cutânea e com laserterapia. Os animais foram sujeitos a indução de feridas, e em seguida, tratados com LLLT (660 nm, 100 mW densidade de 6 J/cm2 de energia, o tamanho do ponto é 0.028cm2 ambos os grupos). No dia da eutanásia, o tecido da ferida cutânea foi recolhido e imediatamente congelados para depois serem centrifugados depois, para análise de determinação dos níveis de malondialdeído-MDA. **Resultados:** Foi observada diferença significativa entre os grupos de níveis de MDA (ANOVA, $p = 0,0001$). O teste pós-hoc de Tukey mostrou valores significativamente mais baixos de MDA nos tecidos irradiados, tanto em animais diabéticos como nos não-diabéticos. A análise de variância do grupo diabético, mostrou diferença significativa ($p < 0,01$), quando comparados todos os grupos, exceto para a comparação de NDI e DI. **Conclusão:** Concluímos que a LLLT foi eficaz na diminuição dos níveis de MDA em ferida cirúrgica aguda em ratos diabéticos.

Palavras chaves: estresse oxidativo, laserterapia de baixa potência, diabetes mellitus, peroxidação de lipídeos

ABSTRACT

Denadai AS. Acute effects of low-level laser therapy (660 nm) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds. Campo Grande; 2013. [Tese – Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Background: Oxidative stress is defined as an imbalance between pro- and antioxidant systems. Laser therapy influences oxidative stress parameters such as the activity of antioxidant enzymes and the production of reactive oxygen species. The aim of this study was to analyze the effects of low-level laser therapy (LLLT) on oxidative stress caused by acute surgical wounds in diabetic rats. **Materials and Methods:** The study included 36 animals divided into 4 groups consisting of 9 animals each. Group NDNI included non-diabetic rats with cutaneous wounds that received laser therapy, group NDI included non-diabetic rats with cutaneous wounds that received laser therapy, group DNI included diabetic rats with skin wounds who did not undergo laser therapy, and group DI included rats with diabetes insipidus and cutaneous wounds and received laser therapy. Cutaneous wounds were induced in the rats, and the animals were then treated with LLLT (660 nm, 100 mW output power density of 6 J/cm2, and spot size of 0.028 cm2 for both groups). On the day of killing the animals, tissue-wrapped cutaneous wounds were collected and immediately frozen, centrifuged, and stored to analyze malondialdehyde (MDA) levels. **Results**: A significant difference was observed within the groups of MDA levels (analysis of variance [ANOVA], $p = 0.0001$). Tukey's posthoc test showed significantly lower values of MDA in irradiated tissues, both in diabetic and non-diabetic rats. ANOVA of the diabetic group revealed a significant difference ($p < 0.01$) when all groups, except NDI and DI, were compared. **Conclusion**: We conclude that LLLT was effective in decreasing MDA levels in acute surgical wounds in diabetic rats.

Keywords: Oxidative Stress, Low-Level Laser Teraphy, Diabetes Mellitus, Lipid Peroxidation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste de hipótese de normalidade para os dados mensurados “Análise da Amostra”. Campo Grande, 2013..... 45

Tabela 2 – Análise da Variância para as variáveis “Análise da Amostra e MDA entre os grupos NDI, NDNI, DNI e DI. Campo Grande, 2013..... 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação das EROs..... 21
Figura 2 – AGEs e Estresse Oxidativo 34
Figura 3 - Fluxograma das divisões e sub-divisões dos grupos experimentais..... 40
Figura 4 – Produção das feridas cutâneas..... 41
Figura 5 - Análise da Amostra entre os grupos NDI, NDNI, DNI e DI. Box Plot com média e desvio padrão..... 46
Figura 6 - Comparação da MDA entre os grupos NDI, NDNI, DNI e DI. Box Plot com média e desvio padrão..... 47
Figura 7 - Diferença entre as médias para a variável MDA. Comparação entre os grupos NDI (1), NDNI (2), DNI (3) e DI (4). (*) valores estatisticamente significativos; (ns) não significativo..... 48

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGE: Produto Avançado da Glicação

ATP – Trifosfafo De Adenosina

CAT - Catalase

CEUA – Comissão de Ética do Uso de Animais

DM – Diabetes Mellitus

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EPC - Célula Progenitora Endoteliai

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas De Oxigênio

GAPDH - Gliceraldeído-3-Fosfatodesidrogenase

GPx - Glutationa Peroxidase

GRS - Glutationa Reduzida

InGaAlP - Fosfeto de Índio Gálio-Alumínio

LAI - laser de alta intensidade

LBP - laser de baixa potência

LLLT – Low-Level Laser Therapy

LPO - Lipoperoxidação

MDA - Malondialdeído

MMP - Metaloproteinases da Matriz

NADPH - Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NO – OXIDO NÍTRICO

PDGF - Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

pH – Potencial Hidrogênionico

RL – Radicais Livres

RLO - Radicais Livres de Oxigênio

SOD - Superóxido Dismutase

STZ – Estreptozotocina

TBA - Ácido Tiobarbiturico

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{1}O_{2}$ - Oxigênio Singlete

cm^{2} – Centímetros Quadrados

FE^{++} - Ferro

g - Grama

$H_{2}O$ – Água

$H_{2}O_{2}$ - Peróxido De Hidrogênio

HOCl - Ácido Hipocloroso

J/cm^{2} - Joules Por Centímetro Quadrado

KCL - Cloreto De Potássio

mg - Miligrmas

mg/dl – Miligramas por Decilitro

Mg/Kg – Miligramas por Quilo

mL – Mililitro

mol/L – Mol por Litro

mW - Megawatt

nm – Micronanometro

O_{2} - Oxigênio

O_{2}^{-} - Radical Superóxido

OH - Radical Hidroxil

RPM – Rotações por Minuto

-SH - Sulfidrilas

-SS - Pontes Dissulfeto

W - Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1 Estresse Oxidativo 19
2.2 Espécies Reativa de Oxigênio (ERO) ou Radicais Livres (RL) 21
2.3 Defesa Antioxidante 24
2.3.1 Antioxidantes Enzimáticos 25
2.3.2 Antioxidantes Não-Enzimáticos 27
2.4 Peroxidação Lipídica (LPO) 28
2.5 Diabetes Mellitus (DM) 30
2.6 Estresse Oxidativo e Diabetes Mellitus 31
2.7 Laserterapia 34
2.8 Laserterapia e Estresse Oxidativo 37
3 OBJETIVOS 38
3.1 Objetivo Geral 38
3.2 Objetivos Específicos 38
4 METODOLOGIA 39
4.1 Amostra 39
4.2 Grupos Experimentais 39
4.3 Indução do Diabetes 40
4.4 Produção das Feridas Cirúrgicas 41
4.5 Irradiação com Laser Fosfeto de Índio Gálio-Alumínio (InGaAlP) 41
4.6 Eutanásia 42
4.7 Coleta e Armazenamento das Amostras 42
4.8 Avaliação de Peroxidação Lipídica 42
4.9 Níveis de Malondialdeido 42
4.10 Análise Estatística 43
5 RESULTADOS 45
6 DISCUSSÃO 49
7 CONCLUSÃO 54
REFERÊNCIAS 55

1 INTRODUÇÃO

O termo estresse oxidativo é utilizado quando se evidencia um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, sendo o primeiro sistema predominante. Quando a formação dos Radicais Livres (RL) / Espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade de defesa do organismo, se observa dano às moléculas biológicas (CONTRERAS *et al.,* 2004; ALVES, 2002).

Para Schneider e Oliveira (2004), as EROs são produzidas naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos, sendo importantes em situações de necessidade de ativação do sistema imunológico. Por outro lado, a produção excessiva de EROs pode levar a situação de estresse oxidativo com efeitos prejudiciais ao organismo, tais como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, agressão a carboidratos e ao DNA.

Por sua vez os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação dos diversos substratos, de moléculas simples a polímeros complexos, através de dois mecanismos: o primeiro compreende a inibição da formação de RL que favorecem a etapa de iniciação e o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na propagação pela doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, o que interrompe a reação em cadeia (SOARES, 2002).

As EROs podem ser benéficos e prejudiciais. Em condições fisiológicas normais, sua produção é rigidamente controlado e existe uma participação tanto de defesa do patógeno como de sinalização celular. No entanto, a insuficiente desintoxicação dessas enzimas ou a sua superprodução gera estresse oxidativo, resultando em danos celulares. O stress oxidativo tem sido associado a diversas doenças inflamatórias. A inflamação é uma resposta fundamental na proteção contra insultos prejudiciais e, portanto, importante para o aparecimento de cicatrização de feridas (WAGENER *et al.*, 2013).

Wagener *et al.* (2013) afirmam que a liberação excessiva de EROs pela mitocôndria, leucócitos ativados e células endoteliais em condições inflamatórias crônicas podem finalmente resultar no dano tecidual da célula e ainda pode promover e agravar a lesão inflamatória. Em muitas doenças

inflamatórias, as estratégias de intervenção atualmente disponíveis falham ou são de sucesso limitado, justificando a necessidade de novas estratégias para o tratamento de condições inflamatórias crônicas. A presença prolongada de estresse oxidativo é postulada para promover e abastecer estes processos inflamatórios deletérios e podem formar um novo alvo para o tratamento de condições inflamatórias crónicas.

Nas feridas agudas tem sido observado um aumento temporário no nível de oxidantes. Mecanismos de defesa antioxidante são baseados em desintoxicação gradual dos oxidantes e sobre um retorno gradual das células ao estado de homeostase. No entanto, em feridas crônicas o processo de desintoxicação é dificultada devido à produção persistente e descontrolada de EROs durante a fase inflamatória. O estresse oxidativo é proposto como um importante fator patogênico em complicações de feridas diabéticas (TIE *et al.,* 2008).

Em situações adversas, o aumento de radicais livres determina a incapacidade do organismo para inibir sua produção associada a alterações estruturais celulares e quadros patológicos como diabetes, aterosclerose, síndrome da isquemia-reperfusão, doenças reumáticas, câncer, doenças pulmonares, além de envelhecimento, entre outros (ZANELA, SOUZA e GODOY, 2007).

Provas indicam que a hiperglicemia e processo avançado de glicoxidação contribuem para a cicatrização comprometida de feridas em pacientes com diabetes (hiperglicemia é uma marca da diabetes e leva a um aumento de EROse danos celulares). A hiperglicemia aumenta a geração de anion superóxido no tecido através da ativação da NADPH oxidase e proteína quinase C, resultando na cicatrização retardada em ratos diabéticos. Por fim o acumulo de EROs leva a danos celulares generalizada e diminuição da neovascularização na ferida (MARROTE *et al.*, 2010).

Estudos de feridas diabéticas são focados principalmente em desbridamento, antibioticoterapia e, em alguns casos, a revascularização cirúrgica (TANG *et al.,* 2013). No entanto, estudos indicaram que a Laserterapia de Baixa Intensidade (*Low-Level Laser Therapy* - LLLT) é capaz de melhorar e acelerar a cicatrização de feridas, mesmo na presença de

diabetes (HOURELD e ABRAHAMSE, 2010; CARVALHO *et al.,* 2010; SILVA *et al*., 2013; SANTOS *et al*., 2010; SEKHEJANE, HOURELD e ABRAHAMSE, 2011). Estes estudos indicam uma melhoria na proliferação de fibroblastos, o aumento da produção de ambos os tipos de colagénio tipo I e III, o aumento da neovascularização. E modulação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatório.

Segundo Gopaul *et al.* (2001) muitas vias metabólicas associadas com a hiperglicemia, tais como a auto-oxidação da glicose, a glicosilação de proteínas e a ativação da via do poliol aumentam a produção de radicais livres nos portadores da doença. Em adição, os mecanismos de defesa para os radicais livres têm sido descritos como reduzidos no diabetes, em particular o glutatione, o superóxido desmutase e a catalase, assim se desenvolvendo o estresse oxidativo.

Dentro deste contexto de situações adversas a Diabetes Mellitus (DM) caracteriza-se por uma síndrome composta por anormalidades no sistema endócrino e metabólico, que tem como elementos fundamentais a deficiência absoluta ou relativa na fração secretora da insulina pelo pâncreas e/ou deficiência na ação da insulina em tecidos alvo. Possui características clínicas como hiperglicemia, dificuldade de cicatrização, alterações vasculares entre outras (DIAS, *et al*., 2004)

A disfunção endotelial também tem sido crescentemente documentada no DM, principalmente em indivíduos com resistência à insulina ou com alto risco para desenvolver DM do tipo 2, nos quais a hiperglicemia está associada a um aumento do estresse oxidativo, levando a um incremento na formação de radicais oxigênio tais como o ânion superóxido, que reage com o Óxido Nítrico (NO), levando à sua degradação (Wajchenberg, 2002).

Vários aspectos da cicatrização de feridas estão sujeitas a oxidação. Assim, o desenvolvimento de um entendimento completo de como a EROs gerada em células relacionadas a ferida podem influenciar o processo de cura, torna-se extremamente importante. Tal compreensão pode resultar em novas estratégias antioxidantes para tratar feridas. Sabendo ainda que muitos fatores de crescimento, como PDGF, dependem de EROs para o seu funcionamento.

Assim, as estratégias baseadas na antioxidação pode servir como adjuntos para dar início a cicatrização de uma ferida crônica (SEN e ROY, 2008).

Tang *et al.* (2013) determina ainda que vários fatores contribuem para o atraso da cicatrização de feridas diabéticas, tais como fator de crescimento, o óxido nítrico (NO), EROs, metaloproteinases de matriz (MMP), microRNA, células progenitoras endoteliais (EPCs), etc.

A aplicação da laserterapia de baixa potência como tecnologia terapêutica na área de fisioterapia tem apresentado um crescimento significativo. As propriedades curativas da radiação a laser, aliadas à segurança do tratamento, parecem ser os principais responsáveis por esse crescimento, o que justifica o aumento do interesse dos pesquisadores da área biomédica para investigar os mecanismos de ação e os efeitos terapêuticos dos lasers de baixa potência (SILVEIRA *et al.,* 2009).

Para Silveira *et al.* (2009) a laserterapia influencia parâmetros de estresse oxidativo como a alteração da atividade das enzimas antioxidantes e a produção de ERO. A absorção da luz do laser acelera a transferência de elétrons (cadeia respiratória) e induz uma produção inicial de ERO, especificamente aumentando a produção de ânion superóxido. Os danos no mecanismo celular como resultado da irradiação do laser e sua influência nos parâmetros oxidativos não estão bem compreendidos, havendo muitos resultados controversos. Entretanto, é possível que, dependendo da dose, do tempo de exposição e da intensidade, a laserterapia possa alterar os mecanismos de defesa contra a produção excessiva de ERO.

Após a lesão inicial, o estresse oxidativo é aumentado devido a inúmeras fontes potenciais de geração de ERO dentro do tecido traumatizado (OZYURT, 2006). A LLLT age de forma parcial nos parâmetros de dano oxidativo podendo minimizá-los, pois aumenta significativamente a produção de ATP no tecido lesionado (KARU, 1999).

Considerando que o estresse oxidativo é alterado em larga escala em diabéticos e que o uso da LLLT pode agir de forma muito efetiva nesse processo devido a essas terapias agirem em vias importantes na produção de ERO, este estudo justifica-se, a fim de avaliar a possibilidade de utilização ou não da LLLT de forma antioxidante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estresse Oxidativo

Em situações normais o oxigênio que penetra na célula é conduzido à mitocôndria para o processo de fosforilização oxidativa. Depois ele é reduzido na mitocôndria pelo sistema citocromo-oxidase, sofrendo uma redução tetravalente à água, com formação de moléculas de ATP e produção de energia. Aproximadamente 98% do oxigênio são reduzidos totalmente à formação de água, entretanto, o oxigênio pode receber menos de quatro elétrons e formar ERO, ou RL. Essa produção representa um processo fisiológico, porém, em determinadas condições, isso pode ocorrer de forma elevada levando ao estresse oxidativo. Nesse caso, algumas dessas espécies reativas, tais como radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem causar danos teciduais (ZANELA, 2007; PRADA *et al.*, 2004).

O termo estresse oxidativo é utilizado quando se evidencia um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, sendo o primeiro sistema predominante. Quando a formação dos RL/ERO excede a capacidade de defesa do organismo, observa-se dano às moléculas biológicas (CONTRERAS *et al.,* 2004; ALVES, 2002). As principais lesões constatadas são: lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação das membranas celulares, carbonilação de proteínas e danos ao DNA, que ocasionam alterações das funções celulares (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; TANIYAMA e GRIENDLING, 2003).

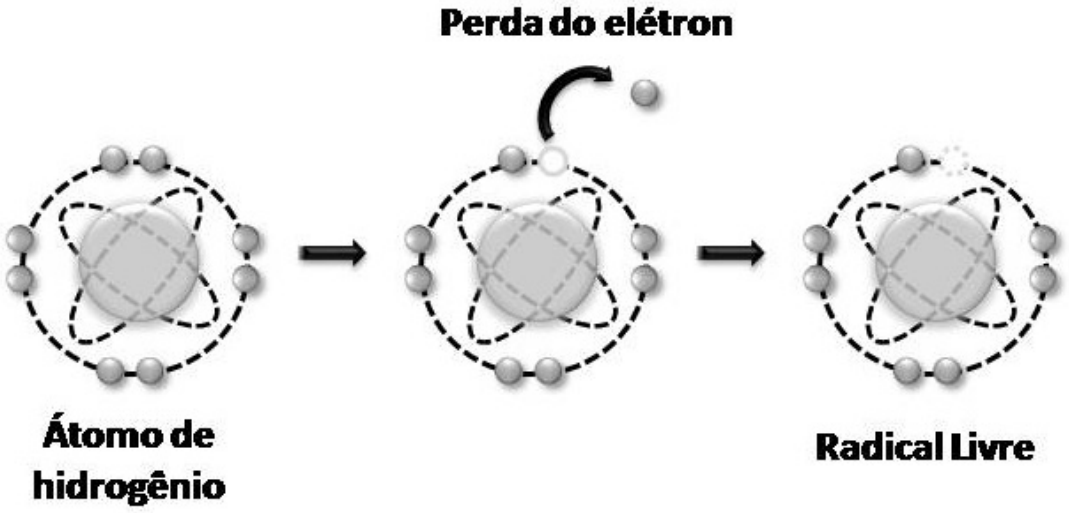

Figura 1 – Formação das EROs. (WOLKMER, 2009).

Levando em consideração o desequilíbrio entre os sistemas pró e anti oxidantes que é causador do estresse oxidativo, Antunes Neto *et al*., (2006) afirmam que dentro de uma estratégia de manutenção do estado redox contra condições oxidantes, o sangue exerce um papel fundamental, fazendo o transporte e redistribuição dos antioxidantes para todo o corpo; dessa maneira, a capacidade antioxidante no sangue pode nos dar estimativas dos níveis de estresse oxidativo.

2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou Radicais Livres (RL)

O termo “Espécies Reativas de Oxigênio” inclui além dos Radicais Livres de Oxigênio (RLO) (como o radical superóxido e o radical hidroxila), espécies não-radicais como, por exemplo, peróxido de higrogênio (H_2O_2), mensageiro secundário na transdução de sinal intra e extra-celular), o ácido hipocloroso (HOCl), agente oxidante produzido por neutrófilos, o oxigênio singlet (uma forma altamente reativa do oxigênio) (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; JOHANSEN *et al.,* 2005).

As EROs são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa. São caracterizadas por grande

instabilidade e elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não-pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons. Os radicais livres podem reagir com as principais classes de biomoléculas, sendo os lipídeos os mais suscetíveis (BROWNLE, 2005).

Nessa tentativa da ERO se estabilizar, através do pareamento de seus elétrons, ela cede ou retira elétrons de átomos ou moléculas na sua vizinhança tornando-os, por sua vez, em novos radicais livres, ocorrendo verdadeiras cascatas oxidativas (ZANELA, 2007).

Sabe-se que tais espécies, que também são conhecidas como radicais livres, são ainda descritas como formadas, principalmente, pela redução incompleta do oxigênio nos processos de geração de energia. O oxigênio consumido tem como principal via de metabolismo o sistema aeróbio, ou seja, a mitocôndria. Esse sistema e responsável pela utilização de 85 a 90% de todo o oxigênio consumido, os outros 10 a 15% são utilizados por enzimas oxidases e oxigenases e por reações químicas de oxidação direta. Dos 85 a 90% de oxigênio que chegam a cadeia de transporte de elétrons, 2 a 5% são reduzidos unilateralmente em metabolitos, tal como as EROs (ANTUNES NETO *et al*., 2005).

Diversas pesquisas sugerem que as ERO se relacionam com várias doenças e, embora muitos mecanismos precisem ser esclarecidos, a literatura aponta diretamente para os efeitos deletérios do excesso de RL (EVANS e HALLIWELL, 2006).

Os RL causam alterações ao DNA (como inativação ou mutação), inativação de proteínas, sejam enzimas ou proteínas de membrana, e inicia a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, processo conhecido como LPO ou peroxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Porém a formação das ERO nem sempre é deletéria. Vários autores citam também um papel fisiológico importante como, por exemplo, a regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox, sinalização das etapas de contração muscular normal (AMORIM e TIRAPEGUI, 2008) além da eliminação de bactérias através da oxidação de íons cloreto para ácido hipocloroso, um potente bactericida (PEREIRA e SOUZA JUNIOR, 2008).

Halliwell e Gutteridge, 2007 afirmam também que os RL são importantes para o organismo, pois eles agem como mediadores de várias funções celulares. Por exemplo, quando as células são agredidas por algum agente estressor (que também pode ser RL) elas acabam produzindo RL para combater estes agentes. Porém cabem alertas que embora esses processos sejam normais para a vida das células, a produção excessiva de ERO pode induzir danos a componentes celulares, entre eles ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos que quando em grande extensão podem levar à morte celular.

As EROs mais estudadas são, o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) por serem produzidas em grande quantidade pelo metabolismo aeróbio (EVANS e HALLIWELL, 2006).

- Radical Superóxido (O_2^-)

Ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Possui ação bactericida, sendo permeável a membranas. E é formado após a primeira redução do O_2. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de O_2^- (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

- Radical Hidroxila (OH^-)

Entre as ERO, o OH^- é considerado, de longe, a espécie mais reativa e danosa da natureza e em teoria pode oxidar qualquer molécula biológica (BAYNES, 2007). É a ERO mais deletéria devido a sua curta meia-vida, o que dificulta seu seqüestro *in vivo* (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

A combinação extremamente rápida do OH^- com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o hidroxila pode inativar

várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

- Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH. O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe++. Assim, é altamente tóxico para as células (HALLIWELL, CHIRICO, 1993; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

- Oxigênio Singlete ($^1O_2$)

É forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O $^1O_2$ tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

2.3 Defesa Antioxidante

Para inibir ou reduzir o efeito negativo das ERO, os organismos apresentam um sistema de defesa antioxidante, abrangendo uma grande variedade de substâncias que, dependendo de sua origem e/ou localização, podem ser classificados em antioxidantes dietéticos, intra e extracelulares. O mecanismo de ação ainda permite classificá-los em: antioxidantes de prevenção, porque impedem a formação dos RL/ERO; antioxidantes

varredores, porque impedem o ataque destas espécies às células; antioxidantes de reparo, pois reparam os danos da molécula de DNA e reconstituição das membranas danificadas (KOURY e DONANGELO, 2003).

Tais sistemas de defesas antioxidantes, incluem as moléculas degradadoras de ERO, ácido úrico, ácido ascórbico, α-tocoferol, moléculas que contêm sulfidril e enzimas antioxidantes, como catalase, glutationa peroxidase (GPx) e superóxido dismutases. Em condições patológicas, em que a produção excessiva de ERO ultrapassa a defesa antioxidante, o estresse oxidativo pode modificar irreversivelmente macromoléculas biológicas, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos, contribuindo para a aterogênese. Acredita-se que a capacidade antioxidante do plasma deva-se principalmente à presença de albumina, por meio de seus grupos tióis, sendo esta considerada a principal molécula antioxidante extracelular (REIS *et al.,* 2008).

Segundo Prada *et al.* (2004) esses mecanismos podem ser químicos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (pro-vitamina A), selênio, cobre, zinco, ácido ascórbico, vitamina E e glutationa reduzida (GSR) diminuem a ação tóxica das EROs produzidas intra e extracelularmente.

A rede antioxidante é habitualmente ativada pela vitamina E, a qual é convertida a radical vitamina E, depois de sofrer oxidação pelos radicais livres. Este radical vitamina E reage subsequentemente com a vitamina C, numa reação não-enzimática, pela qual se regenera a vitamina E. Por sua vez, o radical vitamina C formado pode ser reduzido a vitamina C pela ação do glutatião (LOPES *et al*., 2008).

Para uma melhor distinção entre os vários tipos de antioxidantes, essas biomoléculas são classificadas conforme a sua estrutura em enzimáticos e não-enzimáticos (URSO, CLARKSON, 2003).

2.3.1 Antioxidantes Enzimáticos

O sistema enzimático é a primeira linha de defesa antioxidante, evitando o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. É

formado por diversas enzimas, destacando-se a glutationa peroxidase (GPx); catalase (CAT); e superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000; BELLÓ, 2002). Desta forma, o sistema antioxidante enzimático diminui as EROs e, conseqüentemente a oxidação de estruturas biológicas. Apesar de essas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROs, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente (PRADA *et al*., 2004).

- Glutationa Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis. Embora a GPx tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A GPx apresenta-se sob 4 formas: GPx1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluído do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como conseqüência do ataque dos radicais à base timina do DNA (RAYMAN, 2000).

- Catalase (CAT)

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2. É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da glutationa mediada pelo H_2O_2, em eritrócitos humanos normais, e também inibe as lesões oxidativas do DNA (CHANCE *et al*., 1979; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

- Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição e se apresentam em duas formas. A forma SODcobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. O papel benéfico e protetor da SOD vem sendo demonstrado numa variedade de patologias tanto clínicas quanto pré-clínicas (MAXWELL, 1995).

2.3.2 Antioxidantes Biológicos Não-Enzimáticos

São divididos em hidrofílicos como a Glutationa reduzida, vitamina C, indóis e catecóis e em lipofílicos que são as bioflavonas, vitamina E e carotenóides. A glutationa reduzida (GSH) é o principal antioxidante não-enzimático endógeno e pode ser encontrada em vários tecidos biológicos, sendo que no sangue, 99,5% da GSH é intra-eritrocitária. Sua função antioxidante se dá pela capacidade de ser um doador imediato de elétrons para neutralizar H_2O_2 e lipoperóxidos, e também pela capacidade de seqüestrar EROs (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2000; LIMA *et al.*, 2012).

- Glutationa Reduzida – GSH

Segundo FERREIRA e MATSUBARA (1997) a GSH está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta. Além disso, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e

participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas.

- Vitamina E ou Tocoferol

São líquidos viscosos de cor amarelada, encontrados, em quantidades variadas, nos óleos vegetais. Em altas concentrações, podem favorecer a oxidação. Fisiologicamente não oferecem inconvenientes. São sinérgicos com os ácidos cítrico, tartárico, fosfórico, ascórbico e com aminoácidos (RAMALHO e JORGE, 2006).

É um dos principais antioxidantes naturais. Os tocoferóis são substâncias capazes de capturar elétrons, interrompendo a reação oxidativa (BECKER, 2010).

- Ácido Ascórbico ou Ascorbato

O ácido ascórbico também conhecido como vitamina C é hidrossolúvel e considerada como um antioxidante extracelular importante. Podemos encontrá-los em fontes que incluem frutas cítricas, morangos, melões, kiwis, tomates e folhas verdes. O ascorbato pode atuar como antioxidante diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar o alfa-tocoferol (LIMA *et al*., 2012).

2.4 Peroxidação Lipídica (LPO)

A LPO consiste numa série de reações em cadeia representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação corresponde à fase em que uma espécie reativa, geralmente o radical ·OH, abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metileno, formando um radical lipídico. Este, por ser instável, sofre um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado (SILVEIRA e YOSHIDA, 2004).

Para Ferreira e Matsubara (1997) todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo.

Para Lin *et al.* (2005) a lipoperoxidação parece ser um importante mecanismo subjacente ao dano tecidual. Embora tenha sido demonstrado que enzimas antioxidantes aumentam após o estresse oxidativo, este aumento na defesa antioxidante pode não ser fisiologicamente efetivo quando ocorre um aumento de eventos pró-oxidantes.

Na ocorrência de estresse oxidativo e agressão aos lipídeos, as fosfolipases A e C podem ser ativadas, promovendo a degradação de fosfolípides da membrana celular e liberando grande quantidade de ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico, cuja liberação está diretamente relacionada ao tempo de lesão oxidativa local (ODORIZZI, 2006; CARVALHO, *et al.*, 2009).

A agressão aos fosfolipídeos resulta na produção de endoperóxidos cíclicos que podem interferir na cascata do ácido araquidônico. Isto ocorre visto que os endoperóxidos cíclicos gerados na peroxidação lipídica apresentam maior afinidade de ação pelas enzimas tromboxanes sintases do que pelas prostaglandinas sintases (ODORIZZI, 2006).

O grau de peroxidação dos fosfolipídios é determinado pelas concentrações de malondialdeído (MDA) e o método comumente aplicado de mensuração é o de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER, 1993).

As principais metodologias utilizadas para a avaliação da LPO em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Portanto, é importante utilizar as várias técnicas disponíveis, pois a sua escolha dependerá do propósito do investigador, ou seja, da fase do processo de LPO que se pretenda avaliar. Um método considerado ideal na mensuração da LPO deve: (1) identificar e quantificar produtos derivados especificamente do processo de peroxidação; (2) ter um baixo coeficiente de variação, quando analisadas amostras diferentes de um mesmo indivíduo; (3) não estar sujeito a interferências de outras biomoléculas; (4) empregar técnicas robustas e, portanto, mais confiáveis; (5) não sofrer interferência direta da dieta e (6) ter sensibilidade para mensurar níveis basais dos produtos (GUTTERIGGE 1995; HALLIWELL, 2000).

Para Antunes Neto *et al.* (2008) um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o de análise da formação de substâncias que reagem ao acido tiobarbiturico (TBA). Esse método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o TBA, formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm, ou por fluorescência a 515nm de excitação e 555nm de emissão.

Duarte *et al.* (2008) esclarece ainda que o método TBA é feito através da análise do MDA, onde geralmente sob forte condição ácida e aquecimento, as amostras biológicas reagem com TBA levando à formação de rosa "produtos coloridos que podem ser mensurados por métodos colorimétricos ou fluorimétrico (LYKKESFELDT, 2007). O MDA é composto de três carbonos, e um dos principais produtos finais da peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados (principalmente acido aracdônico) e seus ésteres, sendo formado pela cisão destes ácidos graxos, após a peroxidação.

2.5 Diabetes Mellitus (DM)

O DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da insulina, entre outros. A hiperglicemia interfere no transporte celular de ácido ascórbico (poderoso antioxidante) em várias células, incluindo fibroblastos. A glicose tem uma estrutura similar a do ácido ascórbico, podendo inibir competitivamente seu transporte pelas membranas celulares (WAJCHENBERG, 2002; MAZZANTI, *et al.,* 2003; LADEIRA *et al*., 2011).

A prevalência do diabetes vem crescendo em grandes proporções. Atualmente a doença afeta 170 milhões de pessoas no mundo, sendo esperados 430 milhões para 2030. Do mesmo modo, crescem em número os sujeitos às suas complicações, particularmente aquelas de longo prazo, como: doenças cardiovasculares, nefropatia, retinopatia, neuropatia e úlceras nos membros inferiores. Dentre essas afecções, a última é responsável por um maior número de admissões hospitalares (LADEIRA *et al.,* 2011).

A DM compreende um grupo heterogêneo de transtornos hiperglicêmicos, que afetam o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e estão associados com uma deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina (MAZZANTI, *et al.,* 2003).

É uma doença multifatorial associada ao aumento no risco cardiovascular quando comparado a não-diabéticos. Estudos demonstraram relação direta entre hiperglicemia cronicamente mantida e as complicações micro e macrovasculares. Entretanto, hiperglicemia crônica ou intermitente tem sido identificada na patogênese da lesão endotelial no diabetes e, em particular, no diabetes tipo 1 (DM1), a disfunção endotelial tem sido demonstrada mesmo quando a normoglicemia é alcançada sendo sugerido que

o estresse oxidativo tenha papel central na patogênese das complicações do diabetes (HUVERS *et al*., 1999).

Tanto a DM tipo 1 como a tipo 2, possuem como denominador comum um forte componente genético. Contudo, no que diz respeito à diabetes tipo 2, fatores ambientais adjuvantes, como por exemplo de ordem hormonal, consumo calórico excessivo, sedentarismo e obesidade, têm uma influência significativa na sua patogênese. É reconhecido hoje em dia que o desenvolvimento da diabetes tipo 2 está associado a uma combinação de disfunção das células pancreáticas e insulino-resistência. As células pancreáticas conseguem compensar a resistência à insulina através de um incremento na secreção de insulina, mas com o tempo, uma compensação insuficiente pode levar à instalação de um estado de intolerância à glicose (Lopes *et al.,* 2008).

Durante a hiperglicemia persistente da diabetes, ocorre um aumento da produção de radicais livres de oxigênio através da auto-oxidação da glicose, e esses radicais exercem seus efeitos citotóxicos nos fosfolipídeos de membrana, resultando na formação de MDA, um produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (AYOUB *et al*., 2000; MAZZANTI 2003; KAKKAR *et al*., 1995).

Segundo Reis *et al.* em 2008 mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia com indícios de que a capacidade antioxidante endógena esteja prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a remoção dos radicais livres.

2.6 Estresse Oxidativo e Diabetes Mellitus

De um modo geral, o acentuado aumento do metabolismo da glicose, na hiperglicemia diabética, está associado a uma formação aumentada de radicais livres. Nestas condições, por haver um distúrbio no balanço entre a produção acentuada de radicais livres e as defesas antioxidantes intracelulares (superóxido dismutases, peroxidases e catalases), na membrana celular

(vitamina E, beta-caroteno e coenzima Q) e extracelulares, que como já descrito resultará no assim chamado estresse oxidativo que está relacionado ao desenvolvimento das complicações diabéticas. (BAYNES, 1991; WAJCHENBERG, 2002).

Inúmeros estudos *in vivo* revelam ainda que o estresse oxidativo, secundário à hiperglicemia (e talvez ácidos gordos livres), ocorre antes das complicações mais tardias da diabetes se manifestarem clinicamente, sugerindo que o estresse oxidativo desempenha um papel particularmente relevante na patogênese desta doença (HAMILTON, CHEW e WATTS, 2007).

A hiperglicemia ocasiona aumento de ERO, reduz os níveis de óxido nítrico (NO) ativando a aldose redutase. O aumento do fluxo pela via dos polióis, induzido pelo aumento de ERO, determina maior conversão de glicose a sorbitol, reduzindo fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e glutationa (antioxidante intracelular) e aumentando o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia (LOPES *et al*., 2008).

Além de todas as alterações causadas pelo DM existem ainda fenômenos de estresse oxidativo, devidos a um desequilíbrio entre a produção de ERO e defesas antioxidantes, o que conduz frequentemente a lesão tecidual. É devido à sua capacidade para oxidar diretamente lipídeos, proteínas e DNA, que se crê que as EROs desempenham um papel primordial na patogênese das complicações diabéticas mais tardias. Estes processos fisiológicos intracelulares apresentam habitualmente como consequência a insulino-resistência e a diminuição da secreção de insulina (LOPES *et al*., 2008).

Segundo Makimattila *et al.* (1999) pode-se sugerir que o comprometimento da vasodilatação micro e macrovascular endotélio-dependente estaria intimamente relacionada com a capacidade da insulina em estimular a captação da glicose no tecido muscular esquelético e na regulação da pressão arterial. O defeito comum, captação da glicose mediada pela insulina e a produção de NO também mediada pela insulina, envolveria a via. Como efeito, existem evidências de que o estresse oxidativo, poderia preceder a disfunção endotelial e subseqüente desenvolvimento da resistência à insulina do diabetes do tipo 2.

Sabe-se que é na mitocôndria que se formam as EROs responsáveis pelo processo oxidativo, mas essa organela celular acaba por ser também um alvo fácil dessas mesmas moléculas altamente reativas. Afirma-se ainda que os níveis de expressão das enzimas antioxidantes como a CAT e o GSH, são muito baixos nas células β do pâncreas, comparativamente com os dos outros tecidos, confirmando que estas células são facilmente afetadas por um ambiente oxidativo nocivo, causado pela presença de RL. Portanto, a hipótese de que os fenômenos de estresse oxidativo estão relacionados com a deterioração progressiva das células β do pâncreas parece ganhar força. Vários estudos referem que a disfunção β-pancreática, resulta essencialmente de três fatores: exposição crônica à hiperglicemia; exposição crônica a níveis elevados de ácidos graxos livres e exposição a uma combinação de ambos (LOPES *et al.,* 2008, REIS *et al.,* 2008).

Gopaul *et al.* (2001) descreve que um mecanismo potencial que leva à disfunção endotelial no diabético é a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs: *advanced glycation end products*). Quando as proteínas plasmáticas e da membrana celular estão expostas a concentrações elevadas de glicose por períodos prolongados elas sofrem glicação não-enzimática podendo se depositar na camada sub-endotelial e induzir disfunção endotelial. Podendo inativar o NO e determinar a diminuição da vasodilatação endotélio-dependente. Também podem aumentar a permeabilidade vascular, aumentando a captação de macrófagos subendoteliais o que resulta em ativação da resposta inflamatória local, contribuindo para o estresse oxidativo.

Os AGEs se acumulam na maioria dos órgãos-alvo que podem ser acometidos no diabetes, como rim e retina e, ainda, nas placas ateroscleróticas (14,15). O rim é o principal alvo dos danos mediados por AGEs, tendo em vista que representa o maior sítio de depuração destes produtos (BARBOSA, OLIVEIRA e SEARA, 2008).

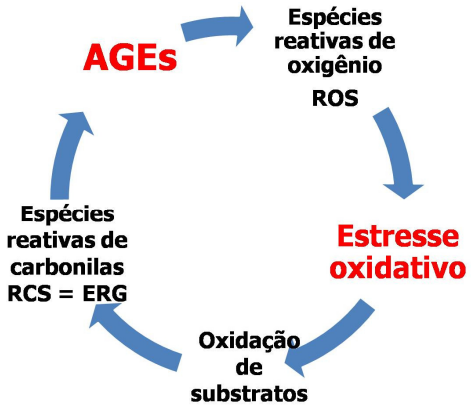

Figura 2: AGEs e Estresse Oxidativo (BUCLKEY e EHRHARDT, 2010)

Brownle (2005), afirma que o mecanismo que parece ser comum a todas as células lesadas, como conseqüência da hiperglicemia, é a produção aumentada de EROs, sendo esta hipótese capaz de unificar todas as vias. A hiperglicemia leva a aumento da PARP (poli ADP-ribose polimerase), enzima envolvida no reparo de danos ao DNA, e conseqüentemente, à diminuição da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase), responsável pela metabolização final da glicose, ativando todas as vias.

Segundo Lopes *et al.* em 2008, já está demonstrado que o estress oxidativo está envolvido no processo de insulino-resistência. Existe uma grande variedade de moléculas sensíveis ao estresse que, quando são ativadas, são responsáveis pela atenuação dos efeitos da cascata de insulina, por esse motivo, conclui-se que a presença de estress oxidativo, gerado das mais diversas formas do DM, está associado não só às complicações diabéticas, mas também à resistência à insulina. Em contrapartida, existem estudos experimentais que demonstram *in vitro*, que o uso de antioxidantes, melhora a sensibilidade à insulina, contrariando então os efeitos do stress oxidativo nas vias descritas anteriormente.

2.7 Laserterapia

O laser é uma onda eletromagnética, constituída por um feixe de fótons de mesma freqüência em coluna, com comprimento de onda. A laserterapia, a partir de sua introdução nos recursos fisioterápicos proporcionou vários benefícios associados ou não a outros recursos fisioterapêuticos (BOURGUIGNON FILHO *et al.,* 2005).

Os aparelhos de laser tornaram-se extensamente e cada vez mais usados na saúde. O uso da terapia com laser de baixa potência já foi amplamente estudado e seus efeitos em condições patológicas altamente comprovados, entre estas aplicações para o laser estão: diminuição da dor, feridas e lesões nervosas. O efeito bioestimulatório do laser foi descoberto em 1960 onde foi demonstrado o aumento na síntese de colágeno dentro de feridas da pele (KHADRA *et al*., 2004; DENADAI *et al*., 2008).

Afirma-se ainda que ele é uma radiação eletromagnética não ionizante, com características de monocromaticidade, coerência, direcionalidade e possibilidade de focalização em pequenas áreas. É classificado em laser de alta intensidade (LAI) que é destinado à remoção, corte e coagulação de tecidos, e laser de baixa potência (LLLT) que é utilizado em processos de reparação tecidual. Os principais efeitos gerados pela LLLT nos tecidos têm natureza estimulatória, causando aumento do metabolismo celular, quimiotaxia e vascularização (THEODORO e GARCIA, 2005; BOURGUIGNON FILHO *et al*., 2005).

Segundo Lirani em 2004, o laser de baixa intensidade pode promover maior velocidade de cicatrização e reparo, aceleração da neovascularização, oclusão de feridas, maior formação do tecido de granulação, maior número de fibroblastos, maior numero de fibras colágenas, aumento na síntese de ATP, liberação de histamina pré-formada, redução do pH intracelular e alterações na proliferação e motilidade celular, fagocitose, resposta imune e respiração.

Para Rocha Júnior *et al.* (2006) a diferença entre os vários tipos de lasers é dada pelo comprimento de onda. Quanto menor o comprimento de onda, maior sua ação e poder de penetração. Os lasers podem ser contínuos

ou pulsáteis. Sua potência é expressa em watts (W), variando de deciwatts a megawatts e a energia medida em joules por centímetro quadrado (J/cm^2), sendo igual à potência multiplicada pelo tempo de aplicação. A energia do laser é absorvida apenas por uma fina camada de tecido adjacente além do ponto atingido pela radiação, sendo por esta razão a recomendação atual para a aplicação de lasers de baixo poder de penetração, com comprimentos de onda entre 640 a 940nm, é que esta aplicação seja realizada de modo pontual à lesão.

De acordo com Kahn (2001) os efeitos primários da interação do laser com a matéria pode ser dividido em três blocos: efeito bioquímico onde o laser pode provocar a liberação de substâncias pré-formadas como a histamina, serotonina e bradicinina, bem como modificar reações enzimáticas normais, tanto acelerando como retardando essas reações; o efeito bioelétrico onde a radiação laser proporciona aumento na produção de ATP, o que promoveria um aumento no consumo de O_2.

O LLLT, segundo Abreu *et al.* (2011), tem ação principalmente nas organelas celulares, em especial nas mitocôndrias, lisossomas e membrana, gerando aumento de adenosina trifosfato (ATP) e modificando o transporte iônico. Existem fotorreceptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, que, ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas. Dessa forma o LLLT acelera, em curto prazo, a síntese de ATP (glicólise e oxidação fosforilativa) e em longo prazo a transcrição e replicação do DNA.

Karu em 2001 propõe um modelo de estimulação dos sistemas biológicos para a luz visível (vermelha). Tal luz promove mudanças fotoquímicas nos receptores das mitocôndria, alterando assim o metabolismo. Ocorrem ainda o envio dos sinais para outras áreas da célula e por fim produção de uma fotoresposta.

O mecanismo exato da LLLT ainda não está completamente esclarecido. A principal teoria consiste na idéia de que a luz laser penetra a epiderme e é absorvida por moléculas fotoaceitadoras, designadas por cromóforos. O efeito luminoso sobre estas moléculas precipita uma cascata de fotobioestimulação, na qual há ativação do metabolismo celular e cicatrização.

A energia cinética das moléculas fotoaceitadoras aumenta, ativando ou desativando enzimas, as quais, por seu turno, são capazes de alterar as propriedades físicas ou químicas de outras macromoléculas. Estudos mais recentes apontam as espécies reativas de oxigênio como os mensageiros secundários-chave produzidos pela LLLT (WALKER *et al*., 2000; BARBOSA *et al.,* 2011).

Alguns autores sugerem ainda que os componentes celulares podem absorver fótons fornecidos através da energia do laser de baixa potência (fotorreceptores) e acelerar a produção de ATP fornecendo energia para a célula, que por sua vez pode modular a resposta inflamatória (ALBERTINI, 2008; SAY, 2003).

2.8 Laserterapia e Estresse Oxidativo

Segundo Eells *et al.* (2004), a exposição ao laser estimula uma atividade eletroquímica mitocondrial extra e um concomitante aumento na síntese de ATP. Sugerem que o citocromo oxidase é o principal fotorreceptor da luz do laser. Adicionalmente, o laser de baixa potência exerce efeito em cascata sobre a sinalização celular, o que promove uma proliferação celular e citoproteção.

Alguns autores postulam ainda que a laserterapia influencia parâmetros de estresse oxidativo, como alteração da atividade das enzimas antioxidantes e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). A absorção da luz do laser acelera a transferência de elétrons (cadeia respiratória) e induz uma produção inicial de ERO, especificamente aumentando a produção de ânion superóxido. Como já descrito a produção em excesso dessas espécies pode acarretar danos nos constituintes celulares, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Os danos no mecanismo celular como resultado da irradiação do laser e sua influência nos parâmetros oxidativos não estão bem compreendidos, havendo muitos resultados controversos. Entretanto, é possível que, dependendo da dose, do tempo de exposição e da intensidade, a laserterapia possa alterar os

mecanismos de defesa contra a produção excessiva de ERO (ABREU *et al.,* 2011).

Muitos estudos têm demonstrado um aumento nas ERO e marcadores de danos oxidativos após dano tecidual. Recentes achados demonstram que a LLLT modula muitos processos bioquímicos principalmente diminuição de danos tecidual, aumento da respiração mitocôndrial e síntese de ATP acelerando o processo de cicatrização (SILVEIRA, 2008).

Para Silveira (2008) a LLLT modula muitos processos bioquímicos como aumento no sistema antioxidante, diminuição de danos musculares, reparo tecidual, ativação de metaloproteases, aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP, acelerando o processo de cicatrização.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Analisar o efeito da LLLT sobre o estresse oxidativo provocado por ferida cirúrgica em ratos diabéticos

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar os níveis de MDA em músculo de ratos diabéticos e não diabético.
- Verificar os níveis de MDA em músculo de ratos diabéticos e não diabéticos irradiado com LLLT.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostra

Foram utilizados 36 ratos adultos do sexo masculino (*Rattus Norvegicus Albinus*) da linhagem *Wistar*, com peso variando de 310 – 350 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Os animais foram mantidos em gaiolas com aproximadamente três animais, sob luz controlada em fotoperíodo e condições de temperatura, com alimentação e água à vontade. O presente trabalho foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA-UFMS), com aprovação nº438/2012 e estavam de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, bem como os padrões do Conselho Internacional para o Laboratório de Ciência Animal.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos e estes divididos em quatro subgrupos:

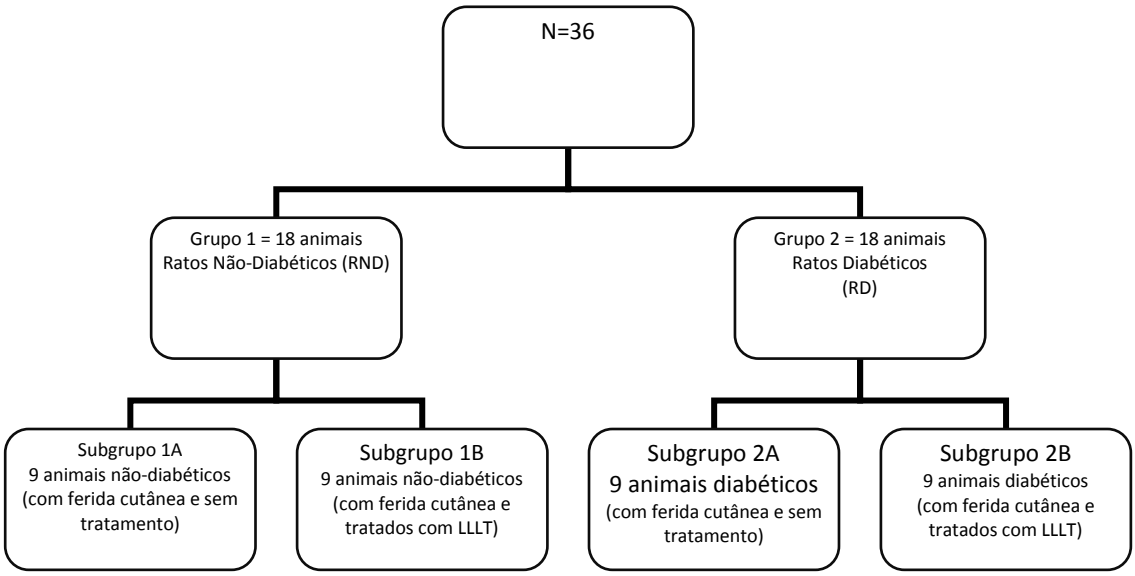

Figura 3 – Fluxograma das divisões e sub-divisões do grupos experimentais

4.3 Indução do Diabetes

A indução do diabetes foi feita de acordo com o protocolo de Graham *et al.* (2011) que é o mais atual e com menor perda de animais, onde os animais foram submetidos a indução de diabetes em jejum durante a noite por uma única injeção intraperitoneal de uma solução recentemente preparada de STZ - 65 mg/kg (STZ - S0130 - Sigma Aldrich ®). Em 0,1 mol / L de tampão citrato (pH 4,5). A dosagem da solução foi de 1 ml/kg. Para prevenir a hipoglicemia fatal, os ratos foram mantidos em solução de glicose a 5% durante 24 h após a injeção de STZ. Para determinar a indução bem sucedida do diabetes ele foi feita a medição da concentração de glicose no sangue dos animais em jejum seis horas após a injeção de STZ. Ratos com um nível de glicose no sangue em jejum de 250 mg/dl foram considerados diabéticos e incluídos no presente estudo.

4.4 Produção das Feridas Cirúrgicas

A produção das feridas cirúrgicas foi realizada após 48 horas da indução do diabetes, através de anestesia com injeção intraperitonial de quetamina (10%) mais xilazina (2%), associadas em uma única seringa, na proporção de 1ml de quetamina (100mg) para 1ml de xilazina (20mg) e administrado 0,1mL da mistura para cada 100g de peso vivo do animal sob técnica asséptica foi feita uma incisão no dorso do animal, de formato redondo com auxílio de um gabarito plástico de 2cm, abordando os planos: pele e fáscia muscular (Figura 4).

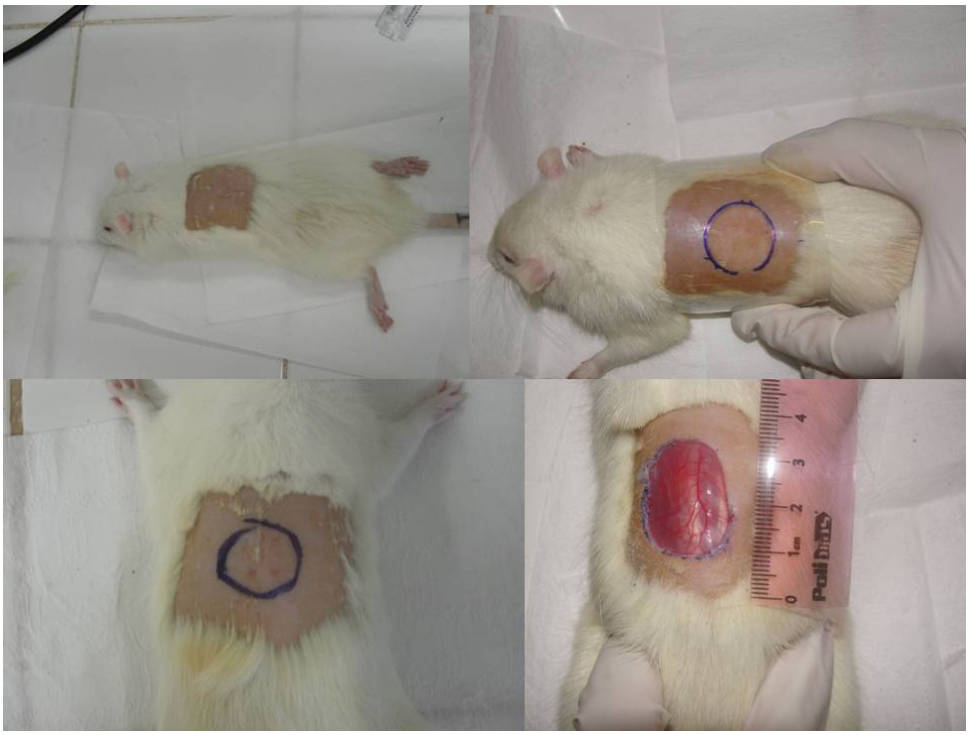

Figura 4 – Produção das feridas cutâneas

4.5 Irradiação com Laser Fosfeto de Indio Gálio-alumínio (InGaAlP)

A irradiação foi feita usando o laser fosfeto de Indio-Gálio-Alumínio (InGaAlP) da DMC modelo Photon Laser III, com potência de 100 mW

(densidade de 3,57 W/cm2), a área do feixe de 0,028 centímetros², e comprimento de onda de 660nm. A aplicação foi feita na forma de dois pontos pelo método transcutânea nas feridas (a área irradiada era equivalente a 1cm^2), com 6 J/cm^2 de energia e tempo de 60s por ponto . A aplicação foi iniciada imediatamente após a cirurgia e realizada duas vezes.

4.6 Eutanásia

Foi feita a eutanásia dos animais após 24 horas de tratamento através da injeção de dose letal de thiopental sódico por via intraperitoneal (150mg/Kg).

4.7 Coleta e Armazenamento das Amostras

Após a eutanásia amostras de tecido foram coletados da área irradiada da ferida e da perna (músculo gastrocnêmio) para análise de músculo não irradiado e imediatamente após a coleta dos tecidos os mesmos foram lavados em solução de cloreto de Potássio (KCL) 1,15%, e embrulhados em papel alumínio, identificados e congelados em nitrogênio líquido.

4.8 Avaliação de Peroxidação Lipídica

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada no Laboratório de Cracinogênese da UFMS, por meio da determinação dos níveis de malondiadeído (MDA) resultantes da peroxidação lipídica pelo método do TBA.

4.9 Níveis de Malondiadeido

O processo de homogenação do tecido iniciou-se com o descongelamento da peça em temperatura ambiente seguida de uma nova lavagem da mesma em solução de KCl 1,15%. Após a peça foi retirada da solução de lavagem, seca cuidadosamente com gases e pesada em balança analítica. Com uma pipeta descartável, acrescentou-se solução de KCl 1,15% a uma proporção de 10:1 em massa. A peça imersa em solução de KCl 1,15% foi cortada em pequenos pedaços, visando facilitar a homogenação. Após o becker contendo o material foi levado para homogenação no triturador (Turratec TE-102). O tempo de permanência da peça no aparelho assim como a sua potência foi regulado individualmente para cada tipo de tecido. Ao término, o homogenado foi passado para um tubo de ensaio. Em seguida, foi centrifugado a 2500rpm por 10 minutos. Foram pipetados 500 microlitros do sobrenadante, e adicionado cerca de 1 ml de TBA levado em banho maria por 1 hora. Após as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Terminado o resfriamento, foram acrescentados a cada tubo de ensaio 1ml do reagente álcool n-Butílico.

À seguir, cada um deles, individualmente, foram misturados em agitador de tubos tipo Vortex (QL-901) por 40 segundos, e centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos. Cerca de 3ml do sobrenadante corado foi colocado em cubetas para leitura no espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de MDA em cada cubeta foi expressa em ng/ml.

Antes de iniciar a leitura das amostras o espectrofotômetro foi calibrado ajustado para leitura a 535nm. A seguir, o aparelho foi zerado com a solução controle (branco), e realizada a leitura do controle padrão para MDA.

Para o cálculo da concentração de MDA foi utilizada uma equação obtida através da curva padrão de absorbância gerada por concentrações conhecidas como padrão.

4.10 Análise Estatística

Os dados foram tabulados no Software Excel 2007 e analisados estatisticamente no Software BioEstat 5.0.

Inicialmente foi observada a forma de distribuição dos dados mensurados. Foi utilizado o teste *D'Agostino*. A hipótese de nulidade, portanto de normalidade, foi rejeitada quando o valor calculado era menor ou igual que o valor crítico mínimo ou igual ou maior que o valor crítico máximo.

Para a hipótese de diferença da magnitude das variações entre os grupos na mensuração da "Análise da Amostra" e "MDA" foi utilizada a análise da variância ANOVA com pós-teste de *Tukey*. O nível de significância foi determinado em $p \leq 0.05$.

5 RESULTADOS

Inicialmente foi observada a forma de distribuição dos dados mensurados. Foi utilizado o teste D'Agostino. A hipótese de nulidade, portanto de normalidade, foi rejeitada quando o valor calculado era menor ou igual que o valor crítico mínimo ou igual ou maior que o valor crítico máximo.

Evidenciou-se aumento não significativo na comparação intergrupos dos níveis de MDA nos tecidos avaliados.

Tabela 1 – Teste de hipótese de normalidade para os dados mensurados "Análise da Amostra".

Grupo	Valor D	Valor crítico 5%	Valor p	Distribuição
NDI	0,2814	0,2513 a 0,2849	>0,05	normal
NDNI	0,2759	0,2513 a 0,2849	>0,05	normal
DNI	0,2817	0,2513 a 0,2849	>0,05	normal
DI	0,2821	0,2513 a 0,2849	>0,05	normal

Para a hipótese de diferença da magnitude das variações entre os grupos na mensuração da "Análise da Amostra" e "MDA" foi utilizada a análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de significância foi determinado em p≤0.05.

Tabela 2 – Análise da Variância para as variáveis "Análise da Amostra e MDA entre os grupos NDI, NDNI, DNI e DI.

Grupos	Análise da Amostra	MDA
NDI	0.030±0.002	410.3090±28.8816
NDNI	0.039±0.002	541.1123±31.8307
DNI	0.046±0.004	631.9861±49.1964
DI	0.033±0.002	450.2385±29.0634
ANOVA	< 0.0001	< 0.0001
Tukey **< 0.01**	NDI *vs* NDNI NDI *vs* DNI NDNI *vs* DNI NDNI *vs* DI DNI *vs* DI	

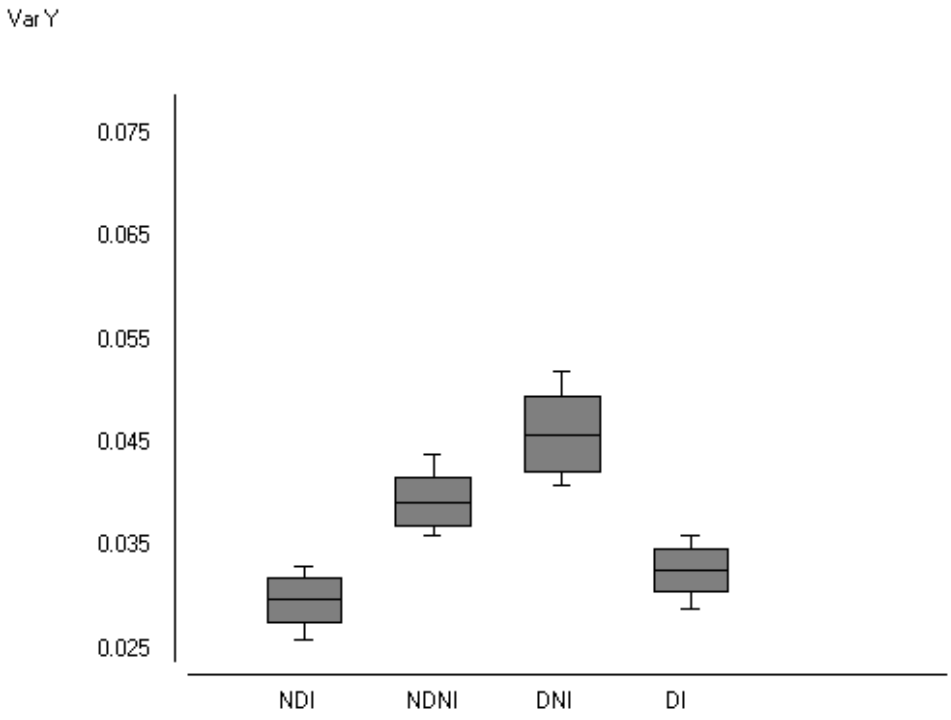

Figura 5 - Análise da Amostra entre os grupos NDI, NDNI, DNI e DI. Box Plot com média e desvio padrão.

FC - Os valores médios para FC foi de 13768.76 para todos os grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

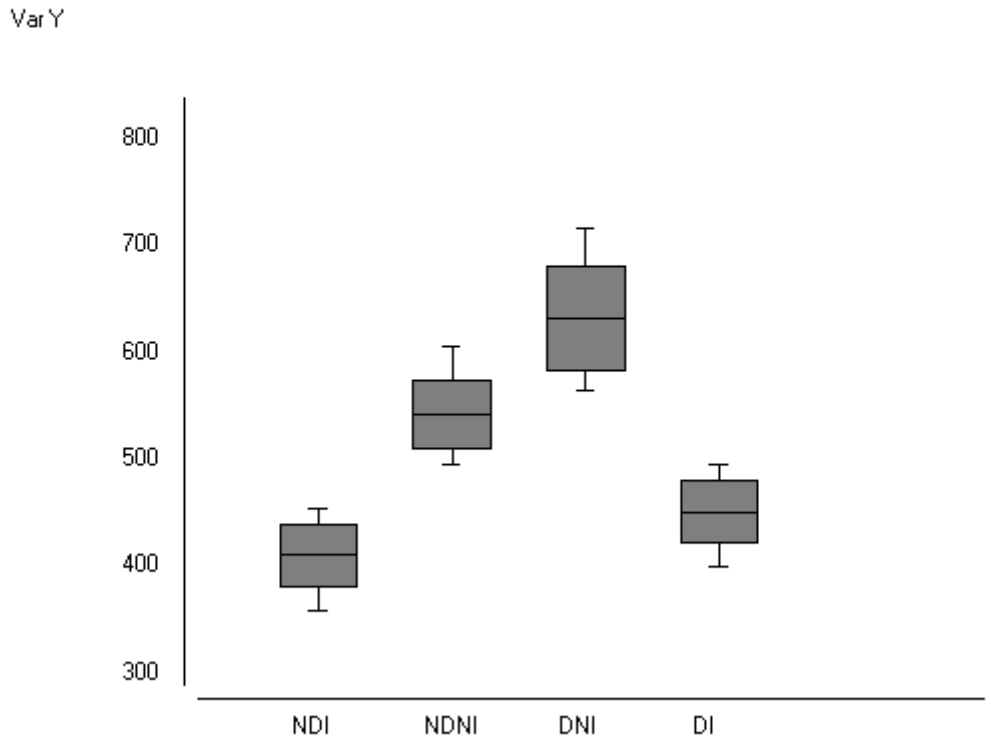

Figura 6 - Comparação da MDA entre os grupos NDI, NDNI, DNI e DI. Box Plot com média e desvio padrão.

Diferença significativa foi observada na comparação intragrupo dos níveis de MDA (ANOVA; $p = 0,0001$). O post hoc test de Tukey apontou valores significantemente inferiores de MDA nos tecidos irradiados, tanto nos animais diabéticos quanto nos não-diabéticos.

Na Análise de variância do grupo diabético observou-se diferença significativa (*Tukey* < 0,01) na comparação entre todos os grupos, com exceção da comparação entre o grupo NDI e DI. Observou-se ainda que a maior significância ocorreu na comparação entre os grupos NDI e DNI.

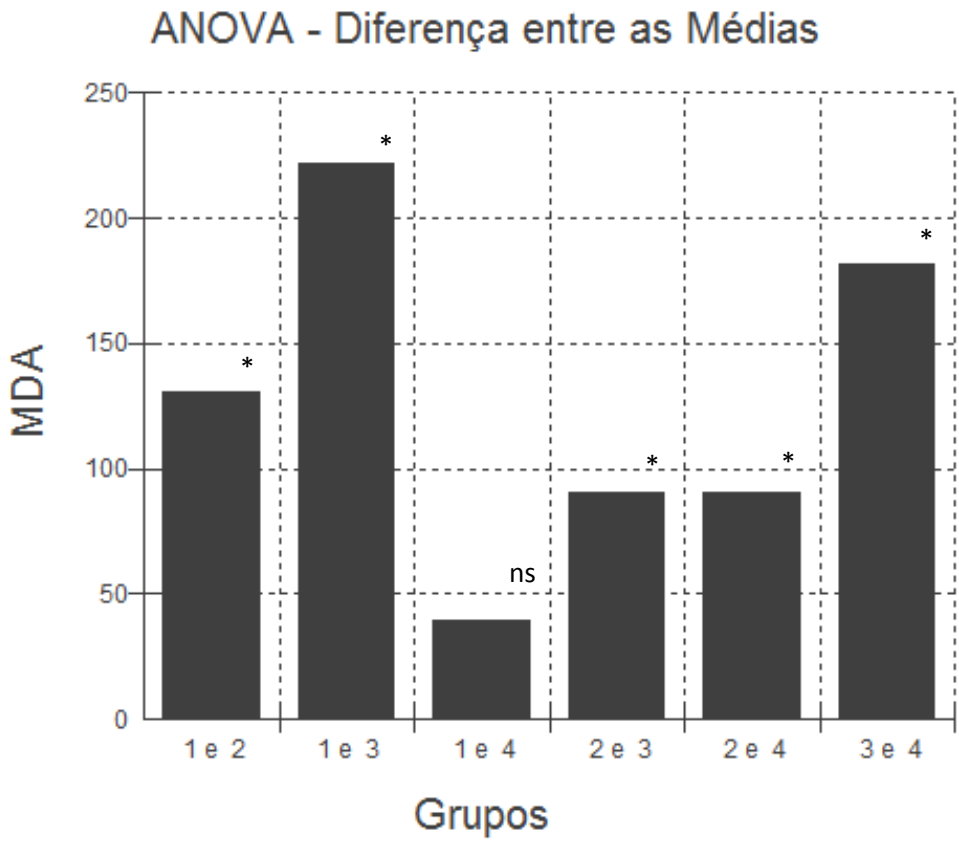

Figura 7 - Diferença entre as médias para a variável MDA. Comparação entre os grupos NDI (1), NDNI (2), DNI (3) e DI (4). (*) valores estatisticamente significativos; (ns) não significativo.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o efeito da LLLT nos níveis dos sinalizadores do estresse oxidativo (MDA) em animais diabéticos e não diabéticos. O resultado aqui encontrado vai de encontro com outros estudos como o de Forgiarini *et al.* em 2010, com animais diabéticos induzida pelo STZ, onde observaram o aumento do estresse oxidativo dos ratos diabéticos em relação aos controles, assim como uma redução na atividade das enzima antioxidante. Tal estudo demonstra ainda haver um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível no tecido pulmonar dos animais diabéticos. E afirmam que o mesmo achado foi exposto por outros autores, entretanto, utilizando, como modelo experimental, coelhos com DM induzida por aloxano.

O objetivo deste trabalho foi pautado nos possíveis efeitos da aplicação do laser de baixa potência sobre os parâmetros de estresse oxidativo induzidos pela diabetes. Para tanto, partimos das seguintes evidências científicas:

1. Após o início dos sintomas da DM, o estresse oxidativo é aumentado devido a inúmeras fontes potenciais de geração de ERO dentro do organismo lesionado (LOPES *et al.*, 2008).
2. A LLLT age de forma parcial nos parâmetros de dano oxidativo (SILVEIRA, 2013).
3. A LLLT aumenta significativamente a síntese de ATP no tecido lesionado (KARU, 1999).

O método de quantificação usado no presente estudo foi o TBA que tem sido amplamente utilizado (YAGI, 1976). O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto detectado através de leitura espectrofotométrica na região do visível. A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos que podem ser determinados por absorção (532 nm) ou por fluorescência (553 nm) (ANTUNES *et al.*; 2008). A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular onde valores maiores de MDA

indicam um nível maior de estresse oxidativo, o que justifica nossos valores maiores que foram encontrados nos grupos diabéticos.

Nossa análise dos níveis de MDA em animais diabéticos, foi realizada no intuito de observar o comportamento do estresse oxidativo frente às alterações causadas pela DM, o que também foi objetivo de Sibbald e Woo (2008) que afirmam que evidências crescentes sugerem ligação causal entre hiperglicemia e estresse oxidativo, o qual leva a danos celulares e várias complicações associadas ao diabetes. Vessby *et al.* (2002) também entram nesse consenso.

O aumento do MDA no grupo diabético em relação ao não-diabético, mesmo com poucos dias de doença vai de encontro com os resultados descritos por Dominguez *et al.* (1998) que avaliando 24 pacientes dentro de sete a dez dias após início clínico do diabetes, demonstraram concentrações elevadas de MDA plasmático, sugerindo que radicais livres de oxigênio possam exercer seus efeitos tóxicos em estágios precoces da doença, mantendo-se elevados no curso dela, ao serem comparados com um grupo de DM1 com 2 a 22 anos de doença e sem complicações. O aumento do índice de estresse oxidativo em animais diabéticos quando comparados com os não-diabéticos também foi vastamente descrito por Reis *et al.* (2008).

Tais índices também são explicados por diversos autores onde as altas concentrações de glicose acabam saturando a enzima hexoquinase da via glicolítica, fazendo com que uma porção deste monossacarídeo acabe seguindo por uma via alternativa de degradação: a via dos poliois, viabilizada pela aldose redutase. Como resultado final, é formado o sorbitol, sendo que as reações que precederam sua formação utilizaram NADPH. Deste modo, a concentração desta última substância acaba diminuindo ainda mais (SIBBALD e WOO, 2008).

Segundo Ladeira *et al.* (2011) no DM, o acréscimo verificado nas atividades da cascata do ácido araquidônico, xantina oxidase, NADPH oxidase e componente semi-ubiquinona da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial leva à formação de radicais livres de oxigênio. Entre eles está o ânion superóxido, o qual pode reagir com NO e dar origem a peroxinitrito, ou ser convertido pela superóxido dismutase a peróxido de nitrogênio. Este último, por sua vez, pode gerar radicais hidroxila, caso esteja na presença de íons cuproso e/ou

ferroso o que pode ser a explicação do motivo do presente estudo ter mostrado que a irradiação pelo laser no animal diabético tenha dado resposta inferior em relação ao não diabético, já que o laser pode também levar ao aumento do ânion superóxido, no início de sua atuação.

Já Forgiarini *et al.* (2013) afirma o mecanismo responsável pelo desenvolvimento do estresse oxidativo é a hiperglicemia, que ativa a via dos polióis, a qual eleva a produção de sorbitol. Esse aumento ocasiona um estresse celular que leva à diminuição das defesas antioxidantes intracelulares. Ainda pode ocasionar um aumento na concentração dos produtos da glicosilação avançada, alterando assim a função celular. Não obstante, a hiperglicemia pode ainda ativar fatores de transcrição nuclear desencadeando um aumento na expressão de mediadores inflamatórios. A combinação desses mecanismos irá alterar a produção de oxidantes, causando o estresse celular e o consequente dano estrutural.

Indo de encontro com a justificativa de nesse estudo realizarmos uma ferida cirúrgica, é que muitos estudos têm demonstrado um aumento nos marcadores de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil em sangue e tecidos de humanos e de animais durante e após a lesão tecidual (PATTWELL, 2004; NIELS, 2005; ZHAO, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Na análise intragrupos observou-se que a irradiação com laser no animal diabético teve um diminuição significativa dos níveis de MDA se comparado com os demais grupos sem irradiação, porém o resultado não pode classificar a LLLT como antioxidante, já que conforme afirma também Silveira *et al.* (2013) em estudo realizado com lesão muscular em ratos wistar conclui que a LLLT foi efetiva no aumento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, provavelmente estimulando a síntese de ATP e acelerando o processo de cicatrização muscular. Já nos parâmetros de estresse oxidativo agiu de forma parcial, sendo necessário avaliação de outros parâmetros para confirmação de tal achado.

Sibbald e Woo (2008), afirmam que o ânion superóxido produzido em excesso no DM, limita a biodiversidade de vasodilatadores ao reagir com NO. O que pode ter sido um efeito deletérico diminuído pela LLLT no presente

estudo, já que a laserterapia comprovadamente possui um efeito benéfico no processo de neovascularização.

Para Camargo *et al*. (2006) existem evidências que apontam para o fato de ocorrer estresse oxidativo, após irradiação laser de baixa potência. Esse resultado são postulados ao inverso dos encontrados no presente estudo, onde observamos que o grupo irradiado com laser possui uma taxa de MDA menor quando comparado com os grupos não irradiados, provavelmente justifica-se pelo tipo de laser e o tempo de irradiação, como afirma Rezende (2007), que descreve que os efeitos biológicos da irradiação com laser de baixa potência dependem de vários fatores como característica, fonte de luz (comprimento de onda, dose e duração de pulso) e estrutura do tecido. Recentemente, a irradiação com laser de baixa potência tem sido usada para modular processos biológicos em humanos e animais (MENDEZ, *et al.,* 2004).

Neste estudo, os resultados indicam uma diminuição nos níveis de MDA que indica uma diminuição dos níveis de estresse oxidativo, estes resultados podem ser corroborados por vários outros estudos que investigaram a ação do LLLT nos índices de estresse oxidativo (SILVEIRA *et al*., 2013; FIRAT *et al.,* 2013; FERARRESI *et al.,* 2012; ASSIS *et al*., 2012).

No seu estudo Kawalec *et al.* (2004), irradiaram ratos com diabetes induzida pela estreptozotocina com um *laser* de HeNe (632,8 nm; densidade de energia 1 J/cm_2) cinco dias por semana até à cicatrização completa. O mesmo autor concluiu haver benefícios semelhantes com um laser de AsGa, embora seja preferível o de HeNe. Tais autores afirmam que LLLT diminui a reação inflamatória, através do processo de aumento da síntese de ATP. O que pode sugerir a validação dos resultados encontrados no grupo irradiado onde devido essa síntese aumentada de ATP o laser parece modular o processo de estresse oxidativo. Segundo os resultados sugeridos nesse trabalho o laser foi eficaz ao diminuir os níveis de MDA em animais não diabéticos, porém quando usado em animais diabéticos devido à grande quantidade de fatores desencadeante do processo oxidativo a laserterapia obteve um resultado inferior nessa modulação.

A justificativa dos resultados que encontramos, vai de encontro com Silveira (2013) que afirma que o aumento na produção de ânion superóxido no

tecido lesionado e a redução deste induzida pelo laser podem estar associados a dois mecanismos principais, primeiramente devido à respiração celular, pois o processo de reparo tecidual exige uma demanda maior de energia o que resulta num concomitante aumento de ânion superóxido e a LLLT consegue reduzir tal demanda. O que sugere que estudos devem ser empregados para confirmar tal diminuição desses níveis em animais sem processos cicatriciais ativos.

Fortalecendo ainda mais os resultados aqui descritos Silveira *et al.* (2009) afirma que a laserterapia influencia nos parâmetros de estresse oxidativo como a alteração da atividade das enzimas antioxidantes e a produção de ERO. A absorção da luz do laser acelera a transferência de elétrons (cadeia respiratória) e induz uma produção inicial de ERO, especificamente aumentando a produção de ânion superóxido. Entretanto, é possível que, dependendo da dose, do tempo de exposição e da intensidade, a laserterapia possa alterar os mecanismos de defesa contra a produção excessiva de ERO.

Assim a LLLT pode modular os níveis de estresse oxidativo, provavelmente pela síntese aumentada de ATP, provocada por ela. Ao analisarmos a atuação isolada da laserterapia em animais não diabéticos, observa-se a maior redução do nível de MDA, e o grupo diabético que não foi submetido há LLLT, confirmamos os altos índices de evolução do estresse oxidativo no DM. Ressalta-se também que quando aplicada a laserterapia em animais diabéticos, os resultados não são tão significativos, nos mostrando que o laser pode modular o estresse oxidativo, porém não deve ainda ser considerado como um antioxidante, já que não consegue eliminar a cascata de oxidação desencadeada pelo diabetes.

Em resumo, sugerimos que o uso da LLLT possui limitações no ataque de ERO em animais saudáveis. A LLLT foi efetiva na diminuição dos parâmetros de estresse oxidativo, mas é necessário avaliação de outros parâmetros para confirmação de tal achado.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a LLLT modula os níveis de estresse oxidativo provocado pela ferida cutânea, bem como pelo DM.

Podemos concluir também que os níveis de MDA em animais diabéticos são extremamente mais elevados que os níveis dos animais não diabéticos. E que a LLLT consegue reduzir significativamente os níveis em ambos os grupos.

Referências Bibliográficas

ABREU, J.A.C.; SOUSA, A.L.S.; ALVES, C.L.G.F.; NUNES, J.T. Análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentaissob ação do laser de baixa potência. **Scientia Medica (Porto Alegre)**, v.21, n.3; p.96-100, 2011.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBIRE, F.; BJORDAL, J.; BRUGNERA, A.; MITTMANN, J.; SILVA, J.A.; COSTA, M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw sub jected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.26, p.19-24, 2008.

AL-WATBAN, F.A.; ZHANG, X.Y.; ANDRES, B.L. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. **Photomed Laser Surgery**. v.25, n.2, p.72-77, 2007.

ALVES, A. A. **Marcadores do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e tecnologia para sua quantificação**. 2002. 88 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Funcional) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.

AMORIM, A.G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio. **Revista de Nutrição**, Campinas. v.21, n.5, p.563-575, 2008.

ANTUNES NETO, J.M.F.; SILVA, L.P.; MACEDO, D.V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento fisico. **Revista Brasileira de Ciências do Movimento**, v.13, p.73-80, 2005.

ANTUNES NETO, J.M.F.; TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; SILVA, L.P.; MACEDO, D.V. Circulating leukocyte heat shock protein 70(HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. **Stress,** v.9, p.107-115, 2006.

ANTUNES NETO, J.M.F.; RIVERA, R.J.B.; CALVI, R.G.; RAFFA, M.F.; DONADON, C.C.; PEREIRA, A.G.; MELO, P.S. Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: *overreaching* induzido por treinamento de natação e câncer. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.14, n.6, nov/dez, 2008.

ASSIS, L.; MORETTI, A.I.; ABRAHÃO, T.B.; CURY, V.; SOUZA, H.P.; HAMBLIN, M.R.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response andoxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Surgery Medicine**. v.44, n.9, p.726-735, nov/2012.

AYOUB, R.S.; YOUSIF, W.H.; AZIZ, B.N. Serum glucose, cholesterol and total lipids levels and tissue lipid peroxidation in alloxan-diabetic rats treated with aqueous extract of Nigella sativa seeds. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v.13, n.1, p.43-49, 2000.

BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica**, v.52, n.6, p.940-6, 2008.

BARBOSA, A.C.; SIMÕES, H.; LORGA, S.; MENDES, M. Laserterapia de baixa potência no tratamento de úlceras diabéticas: Um problema de evidência. **Acta Médica Portuguesa.** v.24, sup.4, pg. 875-880, março, 2011.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. **Diabetes,** v.40, p.405-412, 1991.

BAYNES, J. W. Oxigênio e vida. In: BAYNES, J. W.; MAREK, H. D. **Bioquímica médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 511-520.

BELLÓ, A. **Dano oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres**. Porto Alegre: Editora Ulbra, 2002.

BECKER, C.U. **Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre o estresse oxidativo na musculatura esquelética de ratos com hipertensão arterial pulmonar.** 2010. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Educação Física) – Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BOURGUIGNON FILHO, A.M.; FEITOSA, R.C.A.; BELTRÃO, G.C.; **et al**. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual:

revisão de literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia Cirúrgica Maxilofacial**. v.46, p.37-43, 2005.

BROWNLE, M. The pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. **Diabetes**, v.56, p.1615-1625, 2005.

BUCKLEY, S.T.; EHRHARDT, C. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and the Lung. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Article ID 917108, 11 pages, 2010.

CAMARGO, V.M.; COSTA, J.; SANFELICE, E.A. Estudo comparativo entre dois tipos de raio laser de baixa potência e seus respectivos efeitos sobre a regeneração nervosa periférica. **Fisioterapia em Movimento**, v.19, n.2, p. 127-134, abr./jun., 2006.

CARVALHO, P.T.C.; MAZZER, N.; REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.G.; SILVA, I.S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.21, n.3, 2006.

CARVALHO, A.D.G.; BARBOSA, R.O.; SILVA, R.C. **Biomarcadores do estresse oxidativo após exercício físico exaustivo em ratos wistar.** 2009. 79f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade da Amazônia, Belém, 2009.

CARVALHO, P.T.C.; SILVA, I.S.; REIS, F.A.R.; PERREIRA, D.M.; AYDOS, R.D. Influence of InGaAlP laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n.1, 2010.

CONTRERAS, G. O.; MLER, G.M.; ZÚÑLGA R, A.; CECCATELLI, A.P. Antioxidantes y aterosclerosis. **Revista de Endocrinología y Nutrición**. v. 12, n. 4, p. 199-206, 2004.

DENADAI, A.S.; CARVALHO, P.T.; REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.; PEREIRA, D.M.; DOURADO, D.M; SILVA, I.S.; OLIVEIRA, L.V. Morphometric and histological analysis of low-power laser influence on bone morphogenetic protein in bone defects repair. **Lasers Medicine Science**. v.24, n.5, p.689-95, 2008.

DIAS, A.S.; LLESUY, S.; MARRONI, C.A.; MARRONI, N. Alterações gastrointestinais no Diabetes Mellitus: estresse oxidativo e fluxo sanguíneo da artéria mesentérica – estudo experimental. **Arquivos de Gastroenterologia.** v.41, n.2, p.108-113, abr/jun, 2004.

DOMINGUEZ, C.; RUIZ, E.; GUSSINYE, M.; CARRASCOSA, A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. **Diabetes Care**. v.21, n.10, p.1736-1742, 1998.

DUARTE, M.; NOAL, R.M.; BEM, A.F. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. **RBAC**. v.40, n.2, p.101-106, 2008.

EELLS, J.T.; WONG-RILEY, M.T.; VERHOEVE, J.; HENRY, M.; BUCHMAN, E.V.; KANE, M.P.; GOULD, L.J.; DAS, R.; JETT, M.; HODGSON, B.D.; MARGOLIS, D.; WHELAN, H.T. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**. v.4, n.5-6, p.559-567, 2004.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **The American Journal of Clinical Nutrition,** v.57, n.5, p.779-786, 1993.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **Journal Brasilian of Nutricion**. v.85, n.2, p.67-74. 2006.

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

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FIRAT, E.T.; DAĞ, A.; GÜNAY, A.; KAYA, B.; KARADEDE, M.I.; KANAY, B.E.; KETANI, A.; EVLIYAOĞLU, O.; UYSAL, E. The Effects of Low-Level Laser Therapy on Palatal Mucoperiosteal Wound Healing and Oxidative Stress Status in Experimental Diabetic Rats. **Photomedicine Laser Surgery**. Jun 21. 2013.

FORGIARINI JUNIOR, L.A.; KRETZMANN, N.A.; TIEPPO, J.; PICADA, J.N.; DIAS, A.S.; MARRONI, N.A. Lung alterations in a rat model of diabetes mellitus: effects of antioxidant therapy. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.36, n.5, p.579-587, 2010.

GOPAUL, N.K.; MANRAJ, M.D.; HÉBÉ, A.; LEE KWAI YAN, S.; JOHNSTON, A., CARRIER, M.J. Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. **Diabetologia.** v.44, p.706-712, 2001.

GRAHAM, M.L.; JANECEK, J.L.; KITTREDGE, J.A.; HERING, B.J.; SCHUURMAN, H. The Streptozotocin-Induced Diabetic Nude Mouse Model: Differences between Animals from Different Sources. **Comparative Medicine.** V. 61, N. 4, P. 356–360, Aug/2011.

GUTTERIGGE, J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. **Clinical Chemistry**, v.41, n.12, p.1819-1829, 1995.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research,** v.47, p.410-418, 2000.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: itsmechanism, measurement and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715-725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, v.186, p.1-85, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HAMILTON, S.J.; CHEW, G.T.; WATTS, G.F. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Diab Vasc Dis Res,** v.4, p.89-102, 2007.

HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Low-intensity laser irradiation stimulates wound healing in diabetic wounded fibroblast cells (WS1). **Diabetes Technology Theraphy.** v.12, n.12, p.971-978, 2010.

HUVERS, F.C.; LEEUW, P.W.; HOUBEN, A.J.; HAAN, C.H.; HAMULYAK, K.; SCHOUTEN, H. Endothelium-dependent vasodilatation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1

diabetes under near-normoglycemic conditions. **Diabetes.** v.48, n.6, p.1300-1307, 1999.

JOHANSEN, J.S.; HARRIS, A.K.; RYCHLY, D.J.; ERGUL A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v.4, n.5, 2005.

KAHN, J. **Princípios e prática de eletroterapia**. 4º ed. Rio de Janeiro: Santos; 2001.

KAKKAR, R.; KALRA, J.; MANTHA, S.V.; PRASAD, K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant anzymes in diabetic rats. **Molecular and Celular Biochemistry**, v.151, p.113-119, 1995.

KAWALEC, J.S.; HETHERINGTON, V.J.; PFENNIGWERTH, T.C.; DOCKERY, D.S.; DOLCE, M. Effect of diode laser on wound healing by using diabetic and nondiabetic mice. **Journal Foot and Ankle Surgery**. v.43, n.4, p.214-220, 2004.

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

KARU, T. Photobiological Fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE Journal Quant Electronic**, v.23, p.1703-1717, 2001.

KHADRA, M.; RENOLD, H.J.; LYNGSTADAAS, S.P.; ELLINGSEN, J.E.; HAANAES, H.R. Low-level laser therapy stimulates boné-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clinical oral Implants Research**. v.15, p.325-332, 2004.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, out./dez. 2003.

LADEIRA, P.R.S.; ISAAC, C.; PAGGIARO, A.O.; HOSAKA, E.M.; FERREIRA, M.C. Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares. Revista de Medicina de São Paulo, **v.90, n.3, p.122-127, jul.-set. 2011.**

LIMA, M.C; MARKS, G.; SILVA, I.S.; SILVA, B.A.K.; CÔNSOLO, L.Z.Z.; NOGUEIRA, G.B. Evaluation of oxidative stress in mice subjected to aerobic exercise. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.27, n.8, 2012.

LIN, W.T.; YANG, S.C.; CHEN, K.T.; HUANG, C.C.; LEE, N.Y.. Protective effects of L-arginine on pulmonary oxidative stress and antioxidant defenses during exhaustive exercise in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 8, p. 992-9, ago. 2005.

LIRANI, A.P.R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultrassom e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato.** 2004. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

LOPES, J.P; OLIVEIRA, S.M.; FORTUNATO, J.S. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células ß-pancreáticas - Relação com as complicações da diabetes *Mellitus* tipo 2. **Acta Médica Portuguesa**, v.21, n.3, p.293-302, 2008.

LUCAS, C.; CRIENS, P. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level therapy; were clinical studies justified? A systematic review. Lasers Medicine Science, v.17, p.110-134, 2002.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinical Chim Acta**. v.380, p.50–58, 2007.

MARROTTE, E.J.; DAN-DAN, C.; HAKIM, J.S.; CHEN, A.F. Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice. **Journal Clinical Investigation**. v.120, n.12, p.4207–4219, 2010.

MAKIMATTILA, S.; LIU, M.L.; VAKKILAINEN, J.; SCHLENZKA, A.; LADENPERA, S.; SYVANNE, M. Impaired endotheliumdependent vasodilatation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants. **Diabetes Care**, v.22, p-973-81, 1999.

MAXWELL, S.R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**. v.39, p.345-361, 1995.

MAZZANTI, C.M; SCHOSSLER, D.R.; PRESTES, A.F.D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; CECIM, M. Extrato

da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, n.33, v.6, nov-dez. 2003.

MENDEZ, T.M.T.V.; PINHEIRO, A.L.B.; PACHECO, M.T.T.; NASCIMENTO, P.M.; RAMALHO, L.M.P. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **Journal of Clinical Laser Medicine and surgery**. v.22, n.1, p.19-25, 2004.

MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G.A.; ORIENTI, L.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; ROCCA, M.; TORRICELLI, P.; MARTINI, L.; GIARDINO, R. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In vivo experimental study. **Lasers Medicine Science**, v.13, p.293-298, 1998.

NIELS, B.J.; VOLLAARD, J.; SHEARMAN, P. Exercise-Induced Oxidative Stress. **Sports Medicine**, v.35, p.1045-1062, 2005.

ODORIZZI, V. F. **Efeito de Agaricus sylvaticus sobre o estresse oxidativo em coelhos com aterosclerose**. 2006. 136 f. Tese (Doutorado no curso de pós-graduação em Ciências da Saúde) – Faculdade de medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto, 2006.

OZYURT, B.; IRAZ, M.; KOCA K. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.29, p.197-203, 2006.

PATTWELL, D.M.; JACKSON, M.J. Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v.32, p.14–18, 2004.

PEREIRA, B.; SOUZA JUNIOR, T. P. Exercício físico intenso como pró-oxidante. **Revista Brasileira de Ciências e Movimento**, v. 16, n. 3, p. 1-26, 2008.

PRADA, F.J.A.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.M.A.; GOBATTO, C.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista Brasileira de Ciências e Movimento**, Brasília, v.12, n.2, p. 29-34, junho, 2004.

RAMALHO, C.V.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **Lancet**. v.356, p.233-241, 2000.

REIS, J.S.; VELOSO, C.A.; MATTOS, R.T.; PURISH, S.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.

REZENDE S.B.A.; RIBEIRO M.S. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: Biometrical and histological study in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.87, p.145–153, 2007.

ROCHA, J.C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. **Revista Brasileira de Promoção à Saúde**. v.17, p.44-48, 2004.

ROCHA JÚNIOR, A.M.; OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; ANDRADE, L.C.F.; AARESTRUP, F.M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.81, n.2, 2006.

SANTOS, N.R.; SANTOS, J.N.; REIS, J.A.; OLIVEIRA, P.C.; SOUSA, A.P.; CARVALHO, C.M.; SOARES, L.G.; MARQUES, A.M.; PINHEIRO, A.L. Influence of the use of laser phototherapy (660nm or 790 nm) on the survival of cutaneous flaps on diabetic rats. **Photomedicine Laser Surgery.** v.28, n.4, p.483-488, 2010.

SAY, K.G.; GONÇALVES, R.C.; RENNO, A.C.M.; PARIZATTO, N.A. O tratamento fisioterapêutico de ulceras cutâneas venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. Fisioterapia Brasil. v.4, n.1, p.39-48, 2003.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte.** v.10, n.4, p. 308-313, jul/ago, 2004.

SEKHEJANE, P.R.; HOURELD, N.N.; ABRAHAMSE, H. Irradiation at 636 nm positively affects diabetic wounded and hypoxic cells in vitro. **Photomedicine Laser Surgery.** v.29, n.8, p.521-530, 2011.

SEN, C.K.; ROY, S. Redox signals in wound healing. **Biochimica Biophys Acta.** v.1780, p.1348–1361, 2008.

SIBBALD, R.G.; WOO, K.Y. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. **Diabetes Metabolic Res Rev**. v.24, Supl. 1, p.25-30, 2008**.**

SILVA, A.; LEAL-JUNIOR, E.C.; ALVES, A.C.; RAMBO, C.S.; SANTOS, S.A.; VIEIRA, R.P.; CARVALHO, P.D. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **Journal Cosmet Laser Therapy**. 2013

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 4, p. 367-378, 2004.

SILVEIRA, P.C.L. **Efeitos da aplicação do laser de baixa potência e do ultra-som pulsado sobre os parâmetros de estresse oxidativo e função mitocondrial muscular induzidos por trauma mecânico**. 2008. 92 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2008.

SILVEIRA, P.C.L.; SILVA, L.A.; TUON, T.; FREITAS, T.P.; STRECK, E.L.; PINHO, R.A. Efeitos da laserterapia de baixa potência na resposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.13, n.4, p.281-287, jul/ago. 2009.

SILVEIRA, P.C.; SILVA, L.A.; PINHO, C.A.; SOUZA, P.S.; RONSANI, M.M.; SCHEFFER DDA, L.; PINHO, R.A. Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. **Lasers Medicine Science**. v.28, n.2, p.431-436, 2013.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n. 1, p. 71-81, jan./abr. 2002.

SOMMER, A.P.; PINHEIRO, A.L.B.; MESTER, A.R.; FRANKE R.P. Whelan, biostimulatory windows in low intensity laser activation: lasers, scanners and

NASA's light-emitting diode array system. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v.19, p.29–34, 2001.

STROBEL, N.A.; FASSETT, R.G.; MARSH, S.A.; COOMBES, J.S. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. **International Journal of Cardiology**. v.147, p.191–201, 2011

TANG, Y.; ZHANG, M.J.; HELLMANN, J.; KOSURI, M.; BHATNAGAR, A.; SPITE, M. Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds. **Diabetes**. v.62, n.2, p.6186-27, 2013.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K.K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**. v.42, p.1075-1080, 2003.

THEODORO, L.H.; GARCIA, V.G. Lasers em implantodontia. **Jornal Brasileiro de Clinica Odontológica Integrada**. v.30, p.525-529, 2005.

TIE, L.; LI, X.J.; WANG, X.; CHANNON, K.M.; CHEN, A.F. Endothelium-specific GTP cyclohydrolase I overexpression accelerates refractory wound healing by suppressing oxidative stress in diabetes. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolic**. v. 296, n.6, p.1423-9, 2009.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, p. 41-54, 2003.

VESSBY, J.; BASU, S.; MOHSEN, R.; BERNE, C.; VESSBY, B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. **Journal International Medicine**, v.251, n.1, p.69-76, 2002.

WAGENER, F.A.; CARELS, C.E.; LUNDVIG, D.M. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. **International Journal Molecular Science**. v.14, n.5, p.9126-9167, 2013

WAJCHENBERG, B.L. Disfunção endotelial no Diabetes do Tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica.** v.46, n.5, p.514-519, out, 2002.

WALKER, M.D.; RUMPF, S.; BAXTER, G.D.; HIRST, D.G.; LOWE, A.S. Effect of low-intensity laser irradiation (660nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers in Surgery and Medicine.** v.26, p.41-47, 2000.

WOLKMER, P. **Estudo da Peroxidação Lipídica *in vivo e in vitro* em ratos infectados experimentalmente com Trypanosoma evansi.** 2009, 48f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária), Centro de Ciências Rurais - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

YAGI, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemical Medicine**. v.15, p.212-216, 1976.

ZANELLA, A.M.; SOUZA, L.R.S.; GODOY, M.F. Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.14, n.2, p.107-112, Abr/Jun 2007.

ZHAO, K.; ZHAO, G.; WU, Z. Cell-permeable Peptide Antioxidants Targeted to Inner Mitochondrial Membrane inhibit Mitochondrial Swelling, Oxidative Cell Death, and Reperfusion Injury. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.34682–34690, 2004.