

Efeitos da laserterapia de baixa potência na resposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas

Effects of low-level laser therapy on epidermal oxidative response induced by wound healing

Silveira PCL, Silva LA, Tuon T, Freitas TP, Streck EL, Pinho RA

Resumo

Introdução: O uso terapêutico do laser de baixa potência na fisioterapia tem aumentado significativamente. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da laserterapia de baixa potência nos parâmetros oxidativos na cicatrização de feridas em ratos. **Métodos:** Dezoito ratos Wistar foram divididos randomicamente em 3 grupos (controle 5 dias, n=6; 5 dias/2 J/cm², n=6; 5 dias/4 J/cm², n=6). Uma única ferida circular medindo 8 X 8 mm foi cirurgicamente realizada no dorso do rato. Trinta minutos após a última irradiação, os ratos foram submetidos à eutanásia, e o tecido irradiado foi removido cirurgicamente e armazenado a -70°C. Foi determinada a atividade das enzimas da cadeia respiratória: DCIP oxirredutase (complexo II) e succinato desidrogenase solúvel (SDH), atividade do citocromo c oxidase (complexo IV), produção de ânion superóxido, atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A lipoperoxidação foi avaliada pela técnica de TBARS. **Resultados:** Os resultados mostram uma diminuição na atividade do complexo II nos grupos irradiados por 5 dias com 2 e 4 J/cm², enquanto a produção de ânion superóxido mostrou uma diminuição significativa no grupo irradiado por 5 dias com 4 J/cm² em relação ao grupo controle. Além disso, um aumento significativo na atividade da catalase foi observado no grupo irradiado por 5 dias com 2 J/cm², como também uma diminuição da peroxidação lipídica nos dois grupos irradiados. **Conclusões:** Os resultados do presente estudo indicam que o laser estimula a atividade antioxidante e protege a célula contra danos oxidativos durante o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

Palavras-chave: cicatrização; terapia a laser de baixa intensidade; estresse oxidativo; cadeia respiratória; radicais livres.

Abstract

Background: Therapeutic use of low-level laser in physical therapy has increased significantly. **Objective:** To assess the effects of low-level laser therapy on the oxidative parameters of wound healing in rats. **Methods:** Eighteen Wistar rats were randomly divided into three groups (control, 5 days, n=6; 2 J/cm², 5 days, n=6; 4 J/cm², 5 days, n=6). A single circular wound measuring 8 x 8 mm was surgically created on the rats' backs. Thirty minutes after the last irradiation, the rats were euthanized and the irradiated tissue was surgically removed and stored at -70°C. We determined the activity of the respiratory chain enzymes DCIP oxidoreductase (complex II) and soluble succinate dehydrogenase (SDH); the activity of cytochrome c oxidase (complex IV); the production of superoxide anion; and the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Lipid peroxidation was assessed by means of the TBARS assay. **Results:** There was a decrease in the complex II activity in the groups irradiated for 5 days with 2 and 4 J/cm², while superoxide anion production decreased significantly in the group irradiated for 5 days with 4 J/cm² when compared with the control group. There was also a significant increase in CAT activity in the group irradiated for 5 days with 2 J/cm² as well as a decrease in lipid peroxidation activity in the two irradiated groups. **Conclusions:** The results of the present study indicate that laser stimulates antioxidant activity and protects cells against oxidative damage during the wound healing process in rats.

Keywords: wound healing; low-level laser therapy; oxidative stress; respiratory chain; free radical.

Recebido: 14/02/2008 – **Revisado:** 26/08/2008 – **Aceito:** 12/12/2008

Introdução

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 potência¹.

A laserterapia exerce um importante efeito sobre o processo ulcerativo, resultando na redução do tempo de cicatrização. Essa resposta torna possível um retorno mais rápido do indivíduo às suas atividades de rotina². Entretanto, alguns mecanismos envolvidos nessa resposta ainda permanecem obscuros, principalmente no que se refere aos efeitos do laser sobre a cadeia respiratória mitocondrial e sobre os biomarcadores de estresse oxidativo³.

Segundo Karu⁴, a exposição ao laser estimula uma atividade eletroquímica mitocondrial extra e um concomitante aumento na síntese de ATP. Eells et al.⁵ sugerem que o citocromo c 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 citoproteção⁶.

Alguns autores ainda postulam que a laserterapia influencia parâmetros de estresse oxidativo como a alteração da atividade das enzimas antioxidantes e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)⁷⁻¹⁰. 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 superóxido⁷. A produção em excesso dessas espécies pode acarretar danos nos constituintes celulares, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos¹¹. A membrana celular parece ser o primeiro alvo dos efeitos gerados. Os danos no mecanismo celular como resultado da irradiação do laser e sua influência nos parâmetros oxidativos não estão bem compreendidos, havendo muitos resultados controversos¹². 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 ERO⁷.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da laserterapia de baixa potência na atividade da cadeia respiratória mitocondrial e sobre os parâmetros de estresse oxidativo em resposta à cicatrização de feridas em ratos.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 18 ratos Wistar machos adultos (250-300g), provenientes do Biotério da Universidade do

Extremo Sul Catarinense (UNESC), Santa Catarina. Os ratos foram mantidos em ambiente climatizado (22°C) com ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso a água e alimentação-padrão. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESC, conforme parecer nº 167/2005.

Ulceração e tratamento com laser de baixa potência

Após a anestesia com Cetamina (80 mg/Kg, i.p), a região dorsal dos animais foi tricotomizada, seguindo-se a assepsia com álcool (70%). Na região mediana dorsal, entre a linha infra-escapular e a cauda, uma área circular da pele de aproximadamente 8 mm de diâmetro foi removida com o *punch*¹³.

Os animais foram divididos randomicamente em 3 grupos (n:6): lesão sem tratamento (controle); lesão com tratamento (2 J/cm²); lesão com tratamento (4 J/cm²). As feridas foram tratadas imediatamente após a lesão e por 5 dias consecutivos com laser de baixa potência. Todos os animais foram anestesiados antes de cada aplicação, inclusive o grupo controle (Cetamina - 80 mg/Kg, i.p).

O laser de baixa potência usado neste estudo foi o Arseneto de Gálio (AsGa), forma de onda pulsada, feixe não visível, comprimento de onda de 904 nm, potência de pico de 15 mW, frequência de 2000 Hz, tempo de pulso de 180 ns e área de secção transversal do feixe de 0,07 cm² (Laserpulse - Ibramed). O tempo de aplicação foi de 40 (2 J/cm²) e 80 (4 J/cm²) segundos. Foi realizada aplicação pontual sem contato (distância aproximada de 1 mm), com a caneta mantida perpendicular à lesão em 5 pontos ao redor da ferida, com espaço entre os pontos de 1 cm¹⁴. Após 30 minutos da última irradiação, todos os animais foram submetidos a eutanásia (guilhotina). O tecido ao redor da ferida foi removido, processado, alíquotado e armazenado a -70°C para posteriores análises bioquímicas.

Análises bioquímicas

Atividade das enzimas da cadeia respiratória

Preparação do tecido: o tecido ao redor da ferida foi homogeneizado (1:10 w/v) em tampão SETH, pH 7,4 (250 mM sacarose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/mL heparina). O homogeneizado foi centrifugado a 800 X g por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a -70°C para determinação da atividade enzimática. O período máximo entre a homogeneização e a análise enzimática foi de 5 dias.

Atividade do complexo II + succinato desidrogenase (SDH): as atividades enzimáticas foram medidas pelo método descrito por Fischer et al.¹⁵, em que a diminuição da absorbância do 2,6-DCIP em 600 nm foi usada para o cálculo da atividade

do complexo II. Para o cálculo da SDH, foi utilizado o mesmo sistema na presença de metassulfato de fenazina.

Atividade do complexo IV: a atividade do complexo IV foi determinada de acordo com Rustin et al.¹⁶ e calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido, medido em 550 nm.

Ânion superóxido: determinada pela taxa de oxidação da adrenalina lido em espectrofotômetro a 480 nm, conforme descrito por McCord e Fridovich¹⁷.

Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT): a atividade enzimática da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm)¹⁸. A atividade da CAT foi determinada pela queda na absorbância (240 nm) correspondente ao consumo de peróxido de hidrogênio¹⁹.

Lipoperoxidação: como índice de peroxidação de lipídeos, foi verificada a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBARS) medido espectrofotometricamente (532 nm).²⁰

Determinação da proteína: a quantidade de proteína nos ensaios bioquímicos foi mensurada usando a técnica de Lowry et al.²¹

Análise estatística

Os dados foram expressos em média e erro-padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o SPSS, (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 12.0, como pacote estatístico.

Resultados

Atividade das enzimas mitocondriais

De acordo com a Figura 1B, houve uma diminuição significativa na atividade do complexo II nos grupos irradiados com 2 J/cm² (0,39±0,25) e 4 J/cm² (0,59±0,27) em relação ao grupo sem tratamento (1,51±0,92), porém não foi observada diferença significativa na atividade da SDH e no complexo IV.

Produção de ânion superóxido

Conforme Figura 2, somente o grupo irradiado com 4 J/cm² (25,04±2,23) apresentou uma diminuição significativa na produção de ânion superóxido em relação ao grupo sem tratamento após o tratamento com laser (51,33±3,95).

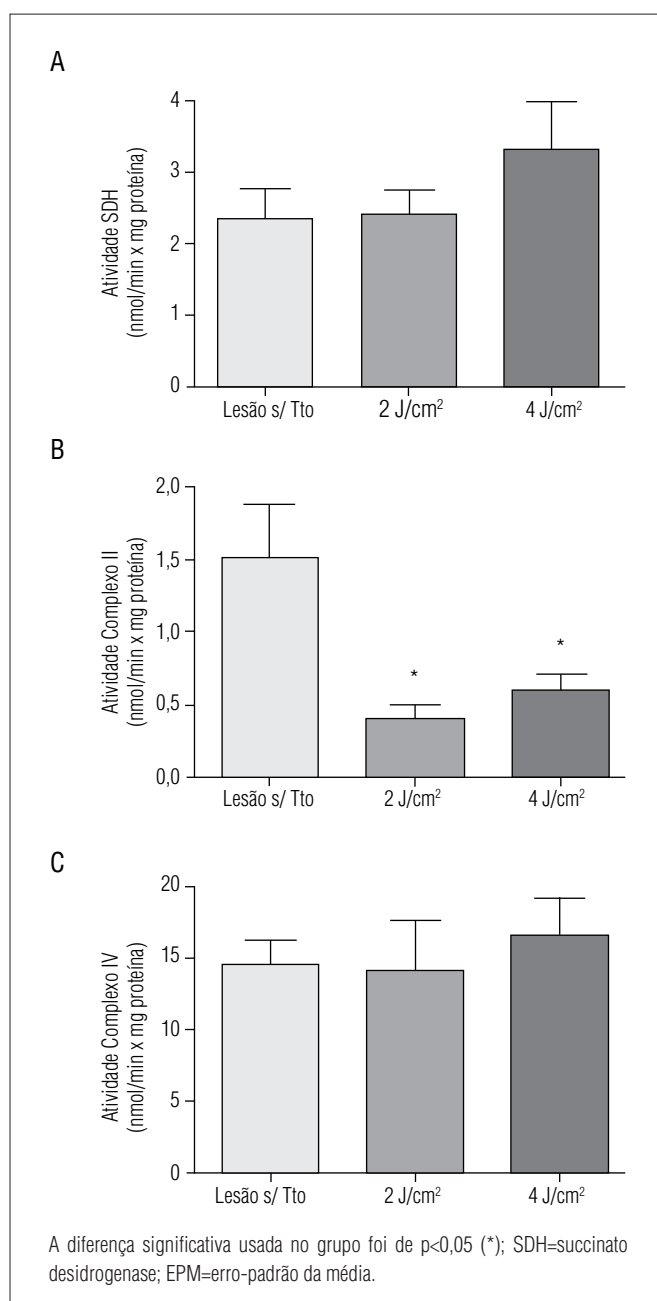


Figura 1. Efeitos da laserterapia de baixa potência na atividade da SDH (A) e nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial II (B) e IV (C). Os valores são apresentados em Média±EPM, e os resultados foram expressos em nmol/min/mg proteína.

Atividade da superóxido dismutase e catalase

Os resultados mostram que não houve alteração significativa na atividade da SOD nos grupos irradiados 5 dias com 2 e 4 J/cm² em relação ao grupo controle (Figura 3A). Porém, a atividade da CAT teve um aumento significativo no grupo irradiado com 2 J/cm² (6,85±0,45) em relação ao grupo sem tratamento (4,31±0,71) (Figura 3B).

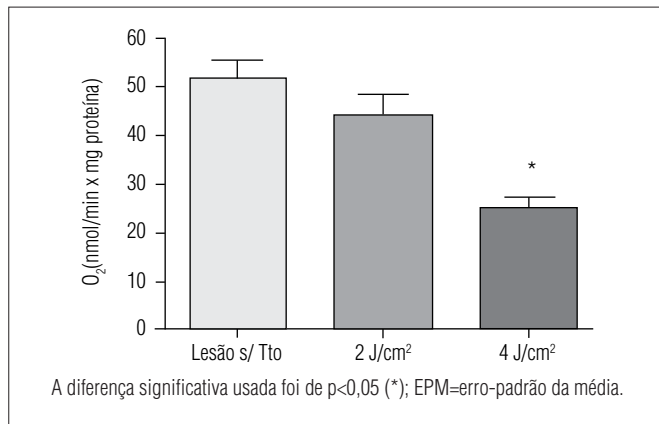


Figura 2. Efeitos da laserterapia de baixa potência na produção de ânion superóxido. Os valores são apresentados em Média±EPM, e os resultados foram expressos em nmol/min/mg proteína.

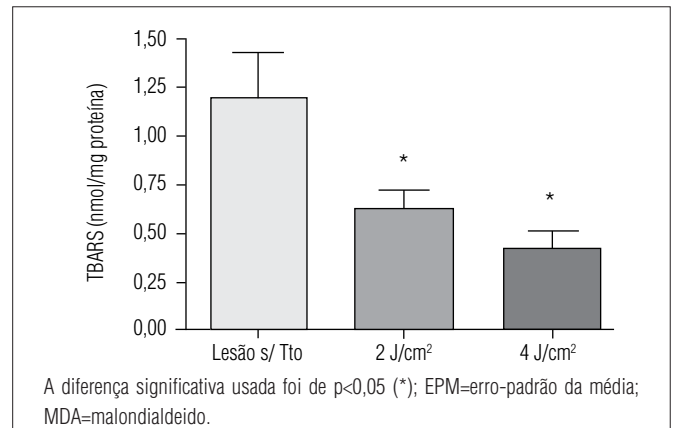


Figura 4. Efeitos da laserterapia de baixa potência nos níveis de lipoperoxidação. Os valores são apresentados em Média±EPM, e os resultados foram expressos em nmol MDA/mg proteína.

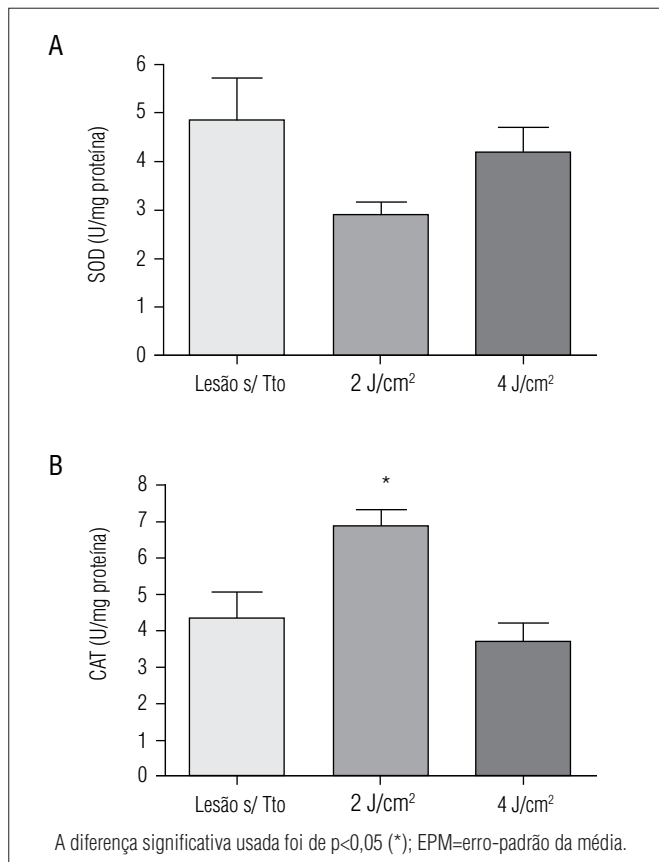


Figura 3. Efeitos da laserterapia de baixa potência na atividade da superóxido dismutase (A) e catalase (B). Os valores são apresentados em Média±EPM, e os resultados foram expressos em U/mg proteína.

Lipoperoxidação

Os resultados de TBARS observados na Figura 4 mostram uma diminuição significativa da peroxidação lipídica nos grupos irradiados 5 dias com 2 J/cm² (0,62±0,10) e 4 J/cm² (0,42±0,09) em relação ao grupo sem tratamento (1,19±0,23).

Discussão

O processo de cicatrização tem um papel essencial na resposta protetora da lesão epidérmica por meio da reparação tecidual²². Esse processo ativa mediadores inflamatórios, como citocinas e ERO, que provocam efeitos nocivos sobre o tecido²³. Nos últimos anos, estudos têm relatado evidências do importante papel das ERO nos distúrbios microvasculares, danos teciduais e processos inflamatórios que precedem à cicatrização tecidual²⁴⁻²⁷.

Neste estudo, foram avaliados os efeitos da laserterapia de baixa potência (904 nm) com intensidade de irradiação diferenciada sobre a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e alguns marcadores de estresse oxidativo.

Em relação à atividade da cadeia respiratória, Figura 1, os resultados mostram uma diminuição significativa na atividade do complexo II nos grupos irradiados com 2 J/cm² e 4 J/cm², respectivamente (Figura 1B).

É possível que o efeito inibitório do complexo II esteja diretamente relacionado com o excesso de irradiação, o que pode produzir uma oxidação completa e conseqüentemente uma redução dos complexos²⁸. Essa inibição não está diretamente associada com a transferência de elétrons, mas, sim, com um rearranjo estrutural parcial ou total, o que leva a um efeito bioinibitório²⁹.

Estudos anteriores indicam que a irradiação com densidade de energia acima de 4 J/cm² possui uma elevada fluência de energia com características inibitórias³⁰. No entanto, observou-se que essa característica inibitória também ocorreu com densidade de energia de 2 J/cm² e 4 J/cm² na atividade do complexo II. É possível que essa resposta diferenciada decorra do tipo de laser e do comprimento de onda utilizados nos estudos, responsáveis pela alta fluência de energia.

Conforme Kreisler et al.³¹, a estimulação dos fotorreceptores pelo laser na cadeia respiratória mitocondrial e a mudança

nos níveis de ATP não estão bem estabelecidos, sendo alvo de várias discussões. Geralmente é aceito que ambos os efeitos estimulatórios e inibitórios do laser nas células sejam dose e comprimento de onda dependente.

A irradiação de baixa potência exerce funções biomodulatórias na atividade celular³². A absorção molecular inicial da luz do laser ainda é desconhecida e, dependendo do comprimento de onda, os efeitos são alterados devido aos diferentes cromóforos que podem ser disponíveis como fotorreceptores. É provável que o processo de fotomodulação seja apenas um aspecto de muitos fenômenos da fotossinalização³³.

As Figuras 1A e 1C mostram que a atividade do complexo IV e SDH não sofreram alterações após o tratamento com laser. Os motivos para isso ainda são desconhecidos e merecem mais investigações. No entanto, estudos anteriores mostram que a irradiação com 2,4 e 3 J/cm² aumenta a atividade do complexo II e IV após 10 dias de irradiação^{27,28}. Acredita-se que esse fato ocorra devido ao maior tempo de exposição, assim ativando cromóforos da cadeia respiratória, principalmente o citocromo c oxidase.

Os resultados deste estudo mostram também uma redução significativa da produção de ânion superóxido (Figura 2) após 5 dias de lesão no grupo irradiado com 4 J/cm².

A resposta inflamatória induzida pela lesão epidérmica provoca a migração de neutrófilos e macrófagos, que realizam um rápido consumo de oxigênio. Esse mecanismo ativa a NADPH-oxidase, catalisando a transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio, formando superóxido³⁴. A laserterapia diminui essa migração de neutrófilos e macrófagos e estimula a atividade fagocitária de leucócitos, reduzindo a duração da fase inflamatória e consequentemente diminuindo a produção de ânion superóxido³⁵.

Acredita-se que a redução observada neste estudo também possa estar associada a um mecanismo de reabsorção mitocondrial, sugerindo que o ânion superóxido pode ser uma fonte de elétrons para a fosforilação oxidativa do ADP⁷.

É importante ainda destacar que o grupo irradiado com 2 J/cm² não apresenta diferença significativa em relação ao controle. Assim, sugere-se que possivelmente exista uma relação dose e tempo-dependente da laserterapia sobre a produção de ânion superóxido.

A enzima SOD representa a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do ânion superóxido. O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é catalisado pela catalase e outras peroxidases¹¹.

Tem sido postulado que o uso do laser de baixa potência induz um aumento na atividade da SOD em diferentes modelos, contribuindo para diminuição dos danos ao tecido e potencialização da cicatrização^{36,37}. Conforme Figura 3A, não houve diferença significativa na atividade da SOD, porém houve um

importante aumento na atividade da CAT no grupo irradiado com 2 J/cm² (Figura 3B).

Em relação à atividade da CAT, os resultados estão de acordo com os de Fulton e Shitabata³⁸, em que a atividade aumentou em peles de ratos após irradiação com laser de baixa potência.

Clinicamente, essa mudança na atividade da CAT, no tecido epitelial, após exposição ao laser, pode ser produzida por geração de radicais livres, causada por mudanças rotacionais em macromoléculas pela fotoestimulação. Essa estimulação pode ser importante porque enzimas antioxidantes são controladas por dose ou duração da exposição³⁹.

A irradiação com laser de baixa potência vem demonstrando eficiência na redução dos danos oxidativos em diferentes modelos e situações⁴⁰.

Os achados, conforme Figura 4, mostram uma diminuição significativa da lipoperoxidação nos grupos tratados com 2 J/cm² e 4 J/cm². Esses resultados sugerem que a laserterapia de baixa potência estimula os mecanismos de defesa contra os danos oxidativos em lipídeos de membrana. Embora a SOD não tenha tido sua atividade aumentada, e a CAT tenha elevada sua atividade somente no grupo irradiado com 2 J/cm², é possível que outros antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estejam envolvidos atuando na proteção contra a oxidação lipídica. Adicionalmente, a fotoestimulação pode aumentar a resistência do tecido contra a lipoperoxidação. Essas variáveis podem justificar os resultados encontrados.

Fillipin et al.³⁶ encontraram valores de TBARS diminuídos significativamente em tendões de ratos irradiados e tratados com laser de baixa potência 14 e 21 dias, mostrando que a irradiação teve um efeito protetor, e as células desenvolveram um papel antioxidante positivo na inativação de excessos de ERO.

Utilizando a irradiação em tecido sanguíneo, Stadler et al.¹⁰ mostraram que os níveis de lipoperoxidação foram elevados após irradiação de baixa potência, sugerindo um aumento na produção de ERO e de hidroperóxidos. Este estudo sustenta a hipótese de que a hemoglobina, nas células vermelhas do sangue, pode servir como uma substância fotorreativa e assim causar a formação de ERO em níveis elevados quando irradiados.

É possível que a diferença nos resultados de lipoperoxidação em diferentes tecidos após a irradiação de baixa potência esteja diretamente associada com o tempo de exposição, intensidade da irradiação e método utilizado para determinação da lipoperoxidação.

Conclusões : : : :

A irradiação com laser de baixa potência diminui a atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, possivelmente relacionado ao tipo de laser e ao comprimento de

onda utilizado. Concluiu-se também que, devido à diminuição na produção de ânion superóxido, o laser de baixa potência poderia atuar na proteção à célula contra danos oxidativos em lipídios de membrana. Possivelmente exista uma relação dose e tempo-dependente da laserterapia sobre a atividade enzimática antioxidante. Assim, estudos adicionais são necessários para elucidar esses mecanismos.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado por subsídios da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências bibliográficas

- Cogo JC, Ribeiro W, Lopes-Martins RAB, Aimbire FSC. Avaliação do efeito de dois lasers de baixa potência AsGa e HeNe na dermatite tópica induzida por óleo de crôton em orelha de camundongos. *Rev Bras Fisioter.* 2002;3(4):207-15.
- Say KG, Gonçalves RC, Renno ACM, Parizatto NA. O tratamento fisioterapêutico de úlceras cutâneas venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. *Fisioter Bras.* 2003;4(1):39-48.
- Kim YG, Pal SC, Lee SR. Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-Ne laser. *Lasers Surg Med.* 2000;27(5):420-6.
- Karu T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quantum Electron.* 1987;23(10):1703-17.
- Eells JT, Wong-Riley MT, VerHoeve J, Henry M, Buchman EV, Kane MP, et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion.* 2004;4(5-6):559-67.
- Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol.* 1996;23(5):492-6.
- Karu TI, Afanas'eva NI. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. *Dokl Akad Nauk.* 1995;342(5):693-5.
- Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985;5(1):31-9.
- Carrinho PM, Ortiz MCS, Santos AS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: efeitos sobre os tecidos biológicos – parte 2. *Fisioter Bras.* 2001;2(6):329-92.
- Stadler I, Evans R, Kolb B, Naim JO, Narayan V, Buehner N, et al. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660nm, on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg Med.* 2000;27(3):255-61.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology medicine.* 2ª ed. New York: Oxford University Press; 2007.
- Nakagawa K. Direct observation of laser generated free radicals from a myocardium target site. *Free Radic Biol Med.* 1992;12(3):241-2.
- Carvalho PT, Mazzer N, dos Reis FA, Belchior AC, Silva IS. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2006;21(3):177-83.
- Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(3):199-204.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Standhouders AM. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985;153(1):23-6.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994;228(1):35-51.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. Enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244:6049-55.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
- Lowry OH, Rosebough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Sullins KE. Lasers and wound healing: practical uses. *Clinical Techniques in Equine Practice.* 2004;3(2):182-7.
- Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: immunological aspects. *Injury.* 2006;37 Suppl 1:S5-12.
- Cuzzocrea S, Thiemermann C, Salvemini D. Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Chem Med Chem.* 2004;11(9):1147-62.
- Khodr B, Khalil Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(1):1-8.

26. Supinski GS, Callahan LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol.* 2007;102(5):2056-63.
27. Silveira PC, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2007;86(3):279-82.
28. Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol.* 1997;66(6):866-71.
29. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B.* 1995;27(3):219-23.
30. Walsh LJ. The current status of lowlevel laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Aust Dent J.* 1997;42(4):247-54.
31. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Low-level 809nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. *Lasers Med Sci.* 2003;18(2):100-3.
32. Schaffer M, Sroka R, Fuchs C, Schrafer-Reichardt U, Schaffer PM, Busch M, et al. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. *J Photochem Photobiol B.* 1997;40(3):253-7.
33. Novoselova EG, Glushkova OV, Cherenkov DA, Chudnovsky VM, Fesenko EE. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2006;22(1):33-8.
34. Fujimaki Y, Shimoyama T, Liu Q, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. *J Clin Laser Med Surg.* 2003;21(3):165-70.
35. Mileva M, Bakalova R, Zlateva G. Low-intensity laser irradiation does not affect the oxidative stress in experimental cataract. *Medical Laser Application.* 2004;19(3):150-4.
36. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, et al. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005;37(4):293-300.
37. Parlato G, Cimmino G, De Vendittis E, Monfrecola G, Bocchini V. Superoxide dismutase activity in the skin of rats irradiated by He-Ne laser. *Experientia.* 1983;39(7):750-1.
38. Fulton JE, Shitabata PK. CO2 laser physics and tissue interactions in skin. *Lasers Surg Med.* 1999;24(2):113-21.
39. Berki T, Nemeth P, Pótló L, Németh A. Effects of photosensitization and low-power helium-neon laser irradiation on liposomes and cell membranes. *Scanning Microsc.* 1991;5(4):1157-64.
40. Potapov AF, Trepilets VE, Mel'nik OB, Shilo Vlu. Effects of intravasal laser irradiation of blood on lipid peroxidation in patients with abdominal surgery. *Anesteziol Reanimatol.* 1995;1:19-22.