



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

Stephanie Nogueira Linares

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NAS
VARIÁVEIS METABÓLICAS, HEMODINÂMICAS E VENTILATÓRIAS
NO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

**SÃO CARLOS
2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

Stephanie Nogueira Linares

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NAS
VARIÁVEIS METABÓLICAS, HEMODINÂMICAS E VENTILATÓRIAS
NO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisioterapia. Área de concentração: Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Aparecida Maria Catai

Coorientador: Prof^º. Dr. Thomas Beltrame

**SÃO CARLOS
2021**

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Stephanie Nogueira Linares, realizada em 05/03/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Aparecida Maria Catai (UFSCar)

Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Vanderlei (UNESP)

Prof. Dr. Michel Silva Reis (UFRJ)

Profa. Dra. Meliza Goi Roscani (UFSCar)

Prof. Dr. Richard Eloin Liebano (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia.

Investigação conduzida no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular (LFCV) – Núcleo de Pesquisas em Exercício Físico (NUPEF) do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Projeto desenvolvido com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Proc. nº 425360/2018-0; 140164/2015-4; 169796/2018-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. nº 2010/52070-4, 2013/07953-3 e 2016/22215-7) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

DIREITO DE REPRODUÇÃO

Autorizamos a reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte. Após dois (2) anos da data da defesa pública desta tese.

São Carlos, 05 de março de 2021.

Prof°. Dra. Aparecida Maria Catai

(Orientadora)

Prof°. Dr Thomas Beltrame

(Coorientador)

Stephanie Nogueira Linares

(Candidata ao título de Doutora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Aos meus pais,

Antonio Carlos Bretas Linares e Neuza Borges Nogueira Linares,

fonte diária de amor, apoio, motivação, honestidade e carinho.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar os meus caminhos e me dar forças para seguir sempre em frente. Por atender as minhas orações, nos cuidar e acalantar nos dias de angustias diante do cenário de incertezas que vivemos.

Aos meus pais, **Antonio Carlos e Neuza**, que por inúmeras vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Tudo o que conquistei até hoje só foi possível porque tive o apoio, o carinho e o amor de vocês. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada. Essa conquista é NOSSA. Amo vocês!

À minha irmã, **Suellen**, meu cunhado, **Darlon** e a minha sobrinha, **Isabela**, por todo o incentivo e motivação. Vocês sempre fazem os momentos de saudade serem superados pelas alegrias dos reencontros.

Ao **Alessandro**, meu presente de Deus. Minha fonte de amor, companheirismo, paciência, inspiração e sabedoria. Que nos últimos meses me acordou com uma xícara de café quentinho e me tranquilizou dizendo: “calma bein, vai dar tudo certo.” Esse último ano foi repleto de mudanças em nossas vidas. Nós mudamos de cidade, de casa e de estilo de vida. Infelizmente, foi preciso nos afastar de quem mais amamos, os nossos pais, mas, escrevemos uma nova história, a nossa! Construída com muita cumplicidade, companheirismo e amor. Nós não sabemos para onde vamos, mas temos a certeza que iremos sempre juntos. Obrigada por tudo. Te amo.

À minha sogra e sogro, **Marice e Fábio**, à avó do Alessandro, **Maria Luiza**, e a tia **Fabiana**, por me acolherem e confiar em mim. Obrigada pelo apoio e torcida.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Aparecida Maria Catai**, pela oportunidade, pelo apoio, pela confiança, pelos ensinamentos transmitidos, por ser exemplo. Dizer apenas um obrigado é pouco para expressar-lhe a minha eterna gratidão.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Thomas Beltrame**, por ser um exemplo de força e determinação, pela prestatividade e constante troca de conhecimento. Sua ajuda foi imprescindível para a realização desse trabalho.

À **Gabriela A. Mesquita Galdino**, **Juliana C. Milan-Matos**, **Maria Cecilia M. Frade** e a **Mariana de Oliveira Gois** companheiras de coletas, que nunca mediram

esforços para me ajudar, e sempre dividiram comigo as angustias e alegrias deste estudo. Agradeço imensamente por toda a dedicação e apoio.

Um agradecimento especial à **Natalia Schichi Valverde** e ao **Luís Henrique Gomes Molina**, os dois alunos de Iniciação Científica que pude coorientar. Vocês não imaginam o quanto contribuíram para o meu crescimento.

Aos meus colegas do Laboratório LFCV, **Ana Carolina, Camila, Claudio, Étore, Giovana, Patrícia, Raphael e Silvia**, pessoas muito especiais, com quem tive a honra de conviver e tomar vários cafezinhos durante a pós-graduação.

Aos Professores colaboradores **Prof. Dr. Cleber Ferraresi, Prof. Dr. Nivaldo Parizotto** e **Prof. Dr. Vanderlei Bagnato** pelos ensinamentos na área da fotobiomodulação e pelas preciosas contribuições neste trabalho.

À **Profa. Dra. Fúlvia de Barros Machado Gobatto** por abrir as portas do seu laboratório para que pudéssemos realizar as análises de glicemia e lactato. E a sua aluna, **Priscila Faleiro de Biase**, que abdicou de realizar suas tarefas do doutorado para me ajudar.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto** e a sua aluna **Katiany Thays Lopes Zangrando** pelo acolhimento e ajuda.

As minhas amigas do coração, **Annelise, Bruna, Jaqueline, Laís, Larissa e Nayara**, pelo carinho e incentivo. Mesmo tomando caminhos diferentes, nosso carinho e preocupação uma com as outras serão eternos.

A minha banca de defesa de doutorado: **Prof. Dr. Luís Carlos Marques Vanderlei, Prof^a. Dr^a. Meliza Goi Roscani, Prof. Dr. Michel Silva Reis e Prof. Dr. Richard Eloin Liebano** e aos membros suplentes **Prof^a. Dr^a. Renata Gonçalves Mendes, Prof. Dr. Carlos Marcelo Pastre e Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini**, por terem aceitado participar deste momento tão especial e pelas valiosas considerações e correções que certamente enriquecerão este estudo.

Aos **professores e funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos. Em especial à **Iolanda**, por todos os cafés, palavras de incentivo e carinho.

A todos os **voluntários** que participaram desta pesquisa, os meus mais sinceros agradecimentos. Sem vocês esse trabalho não teria acontecido. Muito obrigada!

Aos órgãos de fomento **CAPES**, **FAPESP** e especialmente ao **CNPq**, pelo suporte financeiro que viabilizou a realização desta pesquisa (número de processo: 425360-2018-0).

Às **demais pessoas** que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

EPÍGRAFE

“Tanto a ciência como a democracia encorajam opiniões não convencionais e debate vigoroso. Ambas requerem raciocínio adequado, argumentos coerentes, padrões rigorosos de evidência e honestidade. A ciência é um meio de desmascarar aqueles que apenas fingem conhecer”.

Carl Edward Sagan (cientista)

Trecho retirado do livro: ‘O Mundo Assombrado Pelos Demônios: A Ciência vista como uma vela acesa no escuro’

RESUMO

A terapia por fotobiomodulação (TFBM) tem sido amplamente utilizada na melhora da microcirculação, oxigenação tecidual, desempenho e recuperação pós-exercício. Contudo, ainda não há um consenso na literatura sobre qual a janela terapêutica ideal da TFBM nas variáveis cardiovasculares e metabólicas em pacientes com DM2. Assim, a presente tese teve como objetivo investigar qual a janela terapêutica ideal da TFBM por meio de LEDs e se a TFBM potencializa as respostas fisiológicas em diferentes populações como, em jovens saudáveis e em diabéticos. Esta tese é composta por três estudos, apresentados a seguir:

Estudo 1: Objetivo: avaliar os efeitos da terapia de fotobiomodulação (TFBM) por diodo emissor de luz (LED) na oferta e consumo de oxigênio, por meio da NIRS, em humanos. **Métodos:** Doze participantes jovens saudáveis foram estudados com um dispositivo LED (850 nm, 50 mW, 2 J) e *sham* aplicado sobre o terço proximal do músculo flexor ulnar do carpo do antebraço esquerdo ou direito selecionado em ordem aleatória. O LED foi aplicado em contato direto com a pele e o aparelho foi ligado por 40 s em 4 intervenções diferentes (I_1 , I_2 , I_3 and I_4) com intervalo de 3 minutos entre as intervenções. A condição *sham* foi considerada como o período anterior a primeira intervenção da TFBM. O dispositivo NIRS foi usado para avaliar as mudanças relativas na $[O_2Hb]$ e $[HHb]$ antes e depois da condição *sham* e das intervenções. **Resultados:** a TFBM aumentou significativamente a $[O_2Hb]$ em 0,39 μM . **Conclusão:** Esses resultados mostram o potencial da TFBM em aumentar a disponibilidade de oxigênio. **Estudo 2: Objetivo:** verificar o efeito dose-resposta aguda da TFBM por diodos emissores de luz (LEDs) nas respostas hemodinâmicas e metabólicas em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). **Métodos:** Treze participantes com DM2 (idade $52,6 \pm 7,3$ anos) receberam a TFBM por uma matriz de diodo emissor de luz (50 LEDs do tipo GaAlAs, 850 nm, 75 mW por diodo) nos músculos reto e oblíquo do abdome, quadríceps femoral, tríceps sural e isquiotibiais, bilateralmente, utilizando diferentes energias (*sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 Joules - J) em ordem aleatória com intervalo entre as aplicações de pelo menos 15 dias. No dia do protocolo experimental, os sujeitos foram

monitorizados e posicionados em repouso, posição sentada, para a realização da primeira coleta de amostra de sangue do lobo direito da orelha por meio de um capilar heparinizado, para posterior análise dos níveis de glicemia e lactato sanguíneo. Após 5 minutos em repouso, a TFBM (efetivo ou sham) foi aplicada, e uma segunda amostra de sangue foi coletada 1 minuto após a irradiação da TFBM. Por fim, após 15 minutos da irradiação da TFBM, foi realizada a terceira coleta de sangue. **Resultados:** A TFBM por LEDs diminuiu os níveis de glicose sanguínea nos 15 minutos após a aplicação do protocolo de irradiação de 75 e 450 J ($p < 0,05$); reduziu os níveis de lactato sanguíneo 15 minutos após a aplicação do protocolo de irradiação de 75, 450 e 600 J; aumentou o débito cardíaco (\dot{Q}) e índice cardíaco (IC) no 1º minuto após a aplicação do protocolo de irradiação de 75 e 300 J; e reduziu o \dot{Q} e FC nos 15 minutos após a aplicação do protocolo de irradiação de 300 J e 600 J, respectivamente. **Conclusão:** Na população estudada, para modificações positivas nas variáveis hemodinâmicas de repouso, a janela terapêutica ideal está na faixa de 75 a 300 J, enquanto que para as variáveis metabólicas a faixa é de 450 a 600 J, com potência de 75 mW por LED de diodo. **Estudo 3: Objetivo:** avaliar os efeitos dose-resposta agudos da TFBM associado a exercício de moderada intensidade nas respostas hemodinâmicas e ajustes cardiorrespiratórios em sujeitos com DM2. **Métodos:** Treze homens com DM2 (idade $52,6 \pm 7,3$ anos) receberam a TFBM por meio de diodos emissores de luz (50 LEDs do tipo Ga-Al-As, 850 nm, 75 mW por diodo) nos músculos reto e oblíquo do abdômen, quadríceps femoral, tríceps sural e isquiotibiais, bilateralmente, utilizando diferentes energias (*sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 Joules - J) em ordem aleatória com intervalo de pelo menos 15 dias entre as aplicações. Após a TFBM, os voluntários foram submetidos a um protocolo de exercício em cicloergômetro, composto por um aquecimento em carga livre por 3 minutos e um protocolo de carga constante (PCC), por um tempo de 6 minutos, realizado a 80% do limiar de anaerobiose ventilatória (LAv), atingido em teste de exercício cardiopulmonar prévio, e seguido por um protocolo pseudorrandômico binário (PRBS), por um tempo de 17 minutos e 30 segundos, com estágios de carga que oscilaram em 20 e 80% do LAv. **Resultados:** A TFBM potencializou melhora apenas da dinâmica (MNG) do \dot{Q} com a energia de 600 J ($p = 0,014$). **Conclusão:** Em conclusão, nossos achados mostraram que

a TFBM, aplicada em diferentes energias, não promoveu melhora na maior parte das respostas hemodinâmicas e ajustes cardiovasculares. **Conclusões gerais:** Os achados dessa tese nos permitem concluir que: (1) a TFBM quando aplicada em jovens saudáveis é capaz de melhorar a oxigenação tecidual muscular; (2) a TFBM quando aplicada de forma isolada potencializa as respostas metabólicas e hemodinâmicas de repouso na população diabética e, (3) a TFBM quando aplicada previamente a protocolo de exercício de moderada intensidade e duração de 23 min não promove efeitos distintos a aplicação sham nas variáveis hemodinâmicas e na dinâmica de resposta do $\dot{V}O_2$.

Palavras-chave: Fototerapia; Terapia com luz de baixa intensidade; Mitocôndrias; Diabetes mellitus tipo 2; Exercício físico; Consumo de Oxigênio.

ABSTRACT

Study 1: Aim: to investigate, through the NIRS, the acute effects of PBMT by light emitting diode (LED) on the oxygen delivery and utilization in humans.

Methods: Twelve healthy young participants were treated with a LED device (850 nm, 50 mW, 2 J) and *sham* applied over the proximal third of the *flexor carpi ulnaris* muscle of the left or right forearm selected in a random order. The LED was applied in direct contact with skin and the device was switched on for 40 s in 4 different interventions (I_1 , I_2 , I_3 and I_4) with a 3-minute interval between interventions. The *sham* condition was considered as the period before the first PBMT. The NIRS device was used to evaluate the relative changes in $[O_2Hb]$ and $[HHb]$ before and after *sham* and interventions. **Results:** We found that PBMT statistically increased the $[O_2Hb]$ in $0.39 \mu M$. **Conclusion:** These results demonstrate the potential of PBMT to increase oxygen availability.

Study 2: Aim: The main purpose of this study was to verify the acute dose-response effect of PBMT by light emitting diodes (LEDs) on hemodynamic and metabolic responses in individuals with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods:** Thirteen participants with T2DM (age 52.6 ± 7.3 years) received PBMT by a light-emitting diode array (50 GaAIAs LEDs, 850 nm, 75 mW per diode) on the rectus and oblique abdomen, quadriceps femoris, triceps surae, and hamstrings muscle areas, bilaterally, using different energies treatments (*sham*, 75, 150, 300, 450 and 600 Joules - J) in random order with a *wash out* of at least 15 days apart. On the day of the experimental protocol, the subjects were placed at rest, to perform the first blood sample collection from the right ear lobe through a heparinized capillary, for later analysis of blood glucose and blood lactate levels. After 5 minutes of rest, PBMT (effective or *sham*) was applied, and a second blood sample was collected 1 minute after TFBM irradiation. Finally, 15 minutes after TFBM irradiation, the third blood collection was performed. **Results:** The TPBM by LEDs statistically decreased blood glucose levels in the 15 minutes after application of the 75 and 450 J irradiation protocol; reduced blood lactate levels 15 minutes after application of the 75, 450 and 600 J irradiation protocol; increased cardiac output (\dot{Q}) and cardiac index (CI) in the 1st minute after application of the 75 and 300 J irradiation protocol; and reduced \dot{Q} and HR in the 15 minutes after application of the 300 J and 600 J irradiation protocol,

respectively. **Conclusion:** In conclusion, for positive modifications on hemodynamic variables, the ideal therapeutic window was the range from 75 to 300 J, whereas for the metabolic variables was from 450 to 600 J, with a power output of the 75 mW per diode LED. **Study 3: Aim:** The main purpose of this study was to evaluate the acute dose-response effects of TPBM associated with moderate intensity exercise, consisting of a constant load protocol (CL) followed by a binary pseudo random protocol (PRBS), in hemodynamic responses and cardiorespiratory adjustments in subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods:** Thirteen men with T2DM (age 52.6 ± 7.3 years) received PBMT by a light-emitting diode array (50 GaAIAs LEDs, 850 nm, 75 mW per diode) on the rectus and oblique abdomen, quadriceps femoris, triceps surae, and hamstrings muscle areas, bilaterally, using different energies densities (*sham*, 75, 150, 300, 450 and 600 Joules - J) in random order with a *washout* of at least 15 days apart. After the application of TPBM, the volunteers were submitted to a CL followed by a PRBS. After the TFBM, the volunteers were submitted to an exercise protocol in cycle ergometer, consisting of a free load warm-up for 3 minutes and a CL, for a period of 6 minutes, performed at 80% of the ventilatory anaerobic threshold (VAT), achieved in a previous cardiopulmonary exercise test, and followed by a binary pseudorandom protocol (PRBS), for a time of 17 minutes and 30 seconds, with load stages that ranged from 20 to 80% of the VAT. **Results:** We found that TPBM enhanced the improvement of the dynamics (MNG) of \dot{Q} with the energy of 600 J ($p = 0.014$). **Conclusion:** In conclusion, our findings showed that TFBM, previously applied to physical exercise, and in different energy densities, does not promote improvement in most cardiovascular and ventilatory responses. **General conclusions of the study:** The findings of this thesis allow us to conclude that: (1) PBMT applied in healthy young people is able to improve muscle tissue oxygenation; (2) PBMT applied in isolation, enhances the metabolic and hemodynamic responses at rest in the diabetic population, and (3) PBMT applied previously to an exercise protocol of moderate intensity and duration of 23 min, does not promotes distinct effects from the sham application in the hemodynamic variables and in the dynamics of the $\dot{V}O_2$.

Keywords: Phototherapy; low-level light therapy; mitochondria; diabetes mellitus, typ2 2; exercise; oxygen consumption.

LISTA DE FIGURAS

CONTEXTUALIZAÇÃO

Figura 1. Mecanismo de ação da terapia por fotobiomodulação (TFBM) no tecido musculoesquelético.....39

ESTUDO 1

Figura 1. Desenho experimental.....52

Figura 2. Posicionamento do dispositivo de diodo emissor de luz (LED) conectado ao seu controlador e as fibras da NIRS no terço proximal do músculo flexor ulnar do carpo.....53

Figura 3. Concentrações da oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$), deoxi-miohemoglobina ($[HHb]$), miohemoglobina total ($[tHb]$) e diferença de miohemoglobina ($[dHb]$) antes (*Pré*) e após (*Pós*) a intervenção *sham*.....58

Figura 4. Resposta aguda da concentração de oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$) do músculo flexor ulnar do carpo antes (*Pré*) e após (*Pós*) 40 s de terapia de fotobiomodulação promovida por um diodo emissor de luz (LED).....60

Figura 5. Ilustração da concentração de oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$) em a), deoxi-miohemoglobina ($[HHb]$) em b), miohemoglobina total ($[tHb]$) em c) e diferença de miohemoglobina ($[dHb]$) em d) antes do *Pré* e *Pós* a terapia de fotobiomodulação.....61

ESTUDO 2

Figura 1. Desenho experimental.....72

Figura 2. Ilustração da terapia por fotobiomodulação.....74

Figura 3. Fluxograma dos participantes durante o ensaio clínico.....77

Figura 4. Resposta individual dos níveis de glicemia sanguínea (mg/dL) pré e pós aplicação da TFBM.....79

Figura 5. Resposta individual dos níveis de lactato sanguínea (mmol/L) pré e pós aplicação da TFBM.....79

Figura 6. Variação (Δ) dos níveis de glicemia (A) e lactato (B) nos momentos 1 minuto após a TFBM e 15 minutos após a TFBM nas energias *sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J.....80

Figura 7. Resposta individual do débito cardíaco (L) pré e pós protocolo experimental de cada energia.....83

Figura 8. Resposta individual da resistência vascular periférica (mmHg/L/min) pré e pós protocolo experimental de cada energia.....	83
Figura 9. Variação (Δ) das variáveis hemodinâmicas.....	84
Figura 10. Variação (Δ) das variáveis pressóricas e de frequência cardíaca.....	86

ESTUDO 3

Figura 1. Desenho experimental.....	101
Figura 2. Ilustração da resposta do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) durante o protocolo experimental composto por um protocolo de carga constante seguido por protocolo pseudorrandômico binário (PRBS).....	103
Figura 3. Equipamento para terapia por fotobiomodulação.....	104
Figura 4. Áreas de aplicação da terapia por fotobiomodulação por meio de LED.....	105
Figura 5. Ilustração da aquisição dos dados experimentais durante o protocolo experimental em cicloergômetro.....	107
Figura 6. Software em linguagem <i>LabVIEW</i> para a sincronização, filtro e análise inicial dos dados de forma integrada.....	108
Figura 7. Fluxograma.....	110
Figura 8. Magnitude das variações na dinâmica do MNG das variáveis cardiorrespiratórias para as energias <i>sham</i> , 75, 150, 300, 450 e 600 J.....	113
Figura 9. Magnitude das variações na dinâmica do MNG das variáveis da NIRS para as energias <i>sham</i> , 75, 150, 300, 450 e 600 J.....	115
Figura 10. Diferença entre os momentos basal e estado estável para as energias, <i>sham</i> , 75, 150, 300, 450 e 600 J.....	116

LISTA DE TABELAS

CONTEXTUALIZAÇÃO

Tabela 1. Classificação dos dez principais países com maior número de pessoas com diabetes mellitus, com idade entre 20 e 79 anos, em 2019, 2030 e 2045.....	35
Tabela 2. Classificação dos 10 principais países em relação aos gastos com a saúde de pessoas com diabetes, idade entre 20 e 79 anos, em 2019 (dados em bilhões de dólares).....	36
Tabela 3. Definições da terapia por fotobiomodulação.....	38

ESTUDO 1

Tabela 1. Parâmetros da terapia de fotobiomodulação (TFBM) e região da irradiação do LED no corpo.....	53
Tabela 2. Concentrações da oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$), deoxi-miohemoglobina ($[HHb]$), miohemoglobina total ($[tHb]$) e diferença de miohemoglobina ($[dHb]$) antes (<i>Pré</i>) e após (<i>Pós</i>) a intervenção <i>sham</i>	57
Tabela 3. Concentrações da oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$), deoxi-miohemoglobina ($[HHb]$), miohemoglobina total ($[tHb]$) e diferença de miohemoglobina ($[dHb]$) antes (<i>Pré</i>) de quatro terapia de diodo emissor de luz consecutiva (intervenções de 1 a 4).....	59

ESTUDO 2

Tabela 1. Parâmetros de terapia de fotobiomodulação e locais de aplicação.....	75
Tabela 2. Característica clínicas e laboratoriais dos indivíduos (n = 13).....	78
Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis metabólicas nos momentos basais, 1 minuto e 15 minutos pós-PBMT para as energias <i>sham</i> , 75, 150, 300, 450 e 600 J.....	80
Tabela 4. Média e desvio padrão das variáveis hemodinâmicas nos momentos basais, 1 minuto e 15 minutos pós-PBMT para as energias <i>sham</i> , 75, 150, 300, 450 e 600 J.....	81

ESTUDO 3

Tabela 1. Parâmetros da terapia por fotobiomodulação e locais de irradiação.....	105
Tabela 2. Característica clínicas e laboratoriais (n = 13).....	111
Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis metabólicas, hemodinâmicas e ventilatórias nas energias <i>sham</i> , 75, 150, 300, 450 e 600 J.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFSCar: Universidade Federal de São Carlos

PPGFt: Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

LFCV: Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular

NUPEF: Núcleo de pesquisas em exercício físico

IFSC/USP: Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo

NIRS: *Near-infrared spectroscopy*

TFBM: terapia por fotobiomodulação

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DM2: diabetes *mellitus* tipo 2

CEPECE: Centro de Pesquisa em Ciências do Esporte

COVID-19: *Corona Virus Disease 19*

PCC: protocolo de carga constante

PRBS: protocolo pseudorrandômico binário (do inglês: *pseudo random binary sequence*)

ORCID: *Open Researcher and Contributor ID*

Publons: *Evaluating academic research*

DCV: doenças cardiovasculares

DM: diabetes mellitus

DCNT: doenças crônicas não transmissíveis

IDF: *Internacional Diabetes Federation*

EF: exercício físico

O₂: oxigênio

WALT: *World Association for Laser Therapy*

W: watts

J: joules

J/s: joules por segundo

W/cm²: watts por centímetro quadrado

W/s: watts por segundo

J/cm²: Joule por centímetro ao quadrado

Cox: Citocromo C Oxidase

$\dot{V}O_2$: consumo de oxigênio

ATP: adenosina trifosfato

NO: óxido nítrico (do inglês: *nitric oxide*)

EROs: espécies reativas de oxigênio

[*O₂Hb*]: concentrações de oxi-miohemoglobina

[*tHb*]: concentrações de miohemoglobina total

[Hb]: concentrações de hemoglobina

LEDs: diodos emissores de luz (do inglês: *light-emitting diode*)

\dot{Q} : débito cardíaco

RVP: resistência vascular periférica

FC: frequência cardíaca

[*HHb*]: concentrações de deoxi-miohemoglobina

kg: quilograma

cm: centímetros

cm²: centímetros ao quadrado

nm: nanômetros

mW: milliwatts

mW/cm²: milliwatts por centímetros ao quadrado

s: segundos

DP: desvio padrão

ANOVA: análise de variância

[*HHb*]: concentrações de deoxi-miohemoglobina

[*dHb*]: concentrações da diferença da oxi e deoxi-miohemoglobina

μM: micro mols

mm: milímetro

$\bar{x}\mu M$: média por micro mols

Hz: hertz

Δ: delta

IMC: índice de massa corporal

AGEs: produtos finais de glicação avançada (do inglês, *Advanced Glycated End-Products*)

PKC: proteína quinase C (do inglês: *protein kinase C*)

ICTRP: *International Clinical Trials Registry Platform*

OMS: Organização Mundial da Saúde

ECG: eletrocardiograma
AHA: *American Heart Association*
HbA1c: hemoglobina glicada
TECP: teste de exercício cardiopulmonar
HOMA-IR: *homeostatic model assessment of insulin resistance*
VSF: volume sistólico final
PAS: pressão arterial sistólico
PAD: pressão arterial diastólica
PAM: pressão arterial média
IC: índice cardíaco
ASC: área de superfície corporal
IVS: índice de volume sistólico
m²: metro ao quadrado
ml/m²: mililitro por metro ao quadrado
mmHg: milímetro de mercúrio
min/L: minuto por litro
IRVP: índice de resistência vascular periférica
Ga-Al-As: arseneto de gálio e alumínio
NAC: neuropatia autonômica cardiovascular
TAG: transtorno de ansiedade generalizada
ITT: intenção de tratar
bpm: batimentos por minuto
%: porcentagem
μU/ml: microunidades por mililitro
mg/dL: miligrama decilitro
mmol/L: milimol por litro
L: litro
ml: mililitro
mmHg/L/min: milímetros de mercúrio por litros por minuto
mmHg.min/L/m²: milímetros de mercúrio por litros por minuto por metro quadrado
SGLT2: cotransportador sódio-glicose 2
Receptor AT₁: receptor de angiotensina 1
T4: tetraiodotironina
Ẃ: carga de trabalho

MNG: ganho médio normalizado (do inglês: *mean normalized gain*)

VL: vasto lateral

$\dot{V}O_{2\text{-pico}}$: consumo de oxigênio pico

LAv: limiar de anaerobiose ventilatória

rpm: rotações por minuto

seg: segundos

RER: razão de troca respiratória

LabVIEW: Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench

$\Delta\mu\text{M}$: delta micro mols

SUMÁRIO

<u>1. PREFÁCIO</u>	24
<u>2. CONTEXTUALIZAÇÃO</u>	35
<u>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	43
<u>4. ESTUDO 1</u>	48
<u>4.1 INTRODUÇÃO</u>	49
<u>4.2 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	50
<u>4.3 RESULTADOS</u>	56
<u>4.4 DISCUSSÃO</u>	61
<u>4.5 CONCLUSÃO</u>	64
<u>4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	64
<u>5. ESTUDO 2</u>	68
<u>5.1 INTRODUÇÃO</u>	69
<u>5.2 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	70
<u>5.3 RESULTADOS</u>	76
<u>5.4 DISCUSSÃO</u>	86
<u>5.5 CONCLUSÃO</u>	91
<u>5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	92
<u>6. ESTUDO 3</u>	96
<u>6.1 INTRODUÇÃO</u>	97
<u>6.2 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	98
<u>6.3 RESULTADOS</u>	110
<u>6.4 DISCUSSÃO</u>	117
<u>6.5 CONCLUSÃO</u>	119
<u>6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	120
<u>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E DESDOBRAMENTOS FUTUROS</u> ...	124
<u>APÊNDICE A – Termo de consentimento</u>	125
<u>ANEXO A – Estudo 1</u>	130
<u>ANEXO B – Comprovante de submissão - Estudo 2</u>	132
<u>ANEXO C – Comitê de ética</u>	135
<u>ANEXO D – Registro no ReBEC</u>	140

1. PREFÁCIO

A presente tese foi desenvolvida por mim, Stephanie Nogueira Linares, sob orientação da Prof^a. Dra. Aparecida Maria Catai e coorientação do Prof. Dr. Thomas Beltrame. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular (LFCV)/Núcleo de Pesquisas em Exercício Físico (NUPEF), alocado no Departamento de Fisioterapia (DFisio) e Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia (PPG-Ft) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Esta pesquisa se insere na área de ensino da Fisioterapia Cardiovascular e Respiratória, linha de pesquisa de Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia Cardiovascular e Respiratória.

O material da tese é composto por 3 estudos sendo apresentados um no formato de um artigo científico publicado em periódico científico internacional e dois outros manuscritos, sendo um submetido a periódico científico internacional e um terceiro em elaboração. Todos são produtos resultantes das atividades do doutorado.

Para o desenvolvimento dos estudos, contamos com a colaboração e parceria de professores, os quais foram fundamentais e nos auxiliaram em várias etapas dos estudos. Abaixo, apresento-lhes:

- *Prof^a. Dra. Audrey Borghi-Silva*, coordenadora do Laboratório de Fisioterapia Cardiorrespiratória da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar): concessão de uso do US para avaliações da espessura da camada de gordura do músculo vasto lateral estudado e de equipamento para processamento das amostras sanguíneas para medida da glicemia/lactato.
- *Prof^o. Dr. Cleber Ferraresi*, na época docente da Universidade Sagrado Coração e atualmente professor da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar): concepção de vários aspectos de desenho do projeto; desenvolvimento de um dispositivo pontual de 1 LED, manutenção e calibragem dos dispositivos (de 1 LED e de 50 LEDs) de terapia por fotobiomodulação (TFBM).
- *Prof^a. Dra. Fúlvia de Barros Machado Gobatto*, coordenadora do Centro de Pesquisa em Ciências do Esporte (CEPECE) da Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP – Limeira/SP: disponibilização de seu laboratório

para processamento das amostras sanguíneas para medida da glicemia/lactato; treinamento da pós graduanda quanto as técnicas de preparo das soluções químicas, calibração do equipamento e disponibilização da aluna de pós graduação, Priscilla Faleiro de Biase para auxiliar nos processamentos.

- *Profº. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto*, professor da Universidade de Araraquara (UNIARA): concepção de vários aspectos do desenho do projeto; desenvolvimento do dispositivo (manta com 50 LEDs) de terapia por fotobiomodulação (TFBM).
- *Profº. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato*, coordenador do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – IFSC/USP: desenvolvimento do dispositivo (manta com 50 LEDs) de terapia por fotobiomodulação (TFBM) e disponibilização de seu laboratório para calibragem do dispositivo.

O primeiro estudo, com homens jovens saudáveis, foi desenvolvido com o objetivo de investigar o efeito da TFBM na oxigenação tecidual periférica, avaliada pela *Near Infrared Spectroscopy* (NIRS). Este estudo piloto foi fundamental para o delineamento dos ensaios subsequentes, tendo sido desenvolvido entre os anos de 2017 e 2018, e publicado na revista *Lasers in Medical Science* (Qualis A1 e fator de impacto de 2.342).

Em 2018, com o objetivo de adquirir suporte para o desenvolvimento da pesquisa, envidamos esforços conjuntos para a submissão do projeto de pesquisa intitulado “*Efeitos agudos da terapia por fotobiomodulação no sistema aeróbio no diabetes mellitus tipo 2*” (derivado do projeto da presente tese), na Chamada MCTIC/CNPq no. 28/2018-Universal/Faixa C, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), tendo sido aprovado sob o número de processo: 425360/2018-0. O termo de concessão datou de 27/05/2019.

Em seguida, o protocolo experimental foi desenvolvido e deu fruto ao segundo estudo, o qual investigou os efeitos dose-resposta da TFBM nas respostas hemodinâmicas e metabólicas em homens de meia idade com diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). O manuscrito está apresentado nas normas da revista *Frontiers in Physiology* (Qualis A1 e fator de impacto de

3.367), para a qual foi submetida em janeiro de 2021 e encontra-se em processo de revisão.

E, o terceiro estudo, teve como objetivo principal investigar os efeitos da associação da TFBM e do exercício aeróbio de moderada intensidade, em homens com DM2, nas respostas hemodinâmicas e ajustes cardiorrespiratórios. Embora ainda em elaboração, julgamos pertinente incluí-lo na presente tese.

É importante ressaltar que, devido a pandemia e a necessidade do isolamento e distanciamento social como medidas de segurança contra a COVID-19, nos levou a interromper as avaliações, não sendo possível concluir o estudo conforme planejamento inicial. Entretanto, as análises com o número amostral menor do que o previsto nos mostraram resultados interessantes.

Como resultado do conhecimento gerado, foi possível observar que a TFBM, quando aplicada de forma isolada em grupamento muscular pequeno em jovens saudáveis, apresenta benefícios com melhora da oxigenação tecidual. No DM2, outros efeitos positivos são observados: redução dos níveis de glicemia e lactato, aumento do débito cardíaco e diminuição da resistência vascular periférica. Entretanto, quando associada ao exercício físico de moderada intensidade, composto por protocolo de carga constante (PCC), realizado a 80% da carga de trabalho do limiar de anaerobiose ventilatória (LAv) com um tempo de duração de 6 minutos, seguido por protocolo pseudorrandômico binário (PRBS), o qual as cargas de trabalho oscilaram entre 20 e 80% do LAv com um tempo de duração de 17 minutos e 30 segundos, as respostas observadas nos sugerem que a TFBM não potencializou ou influenciou as respostas hemodinâmicas e ajustes cardiorrespiratórios, uma vez que as energias efetivas mostraram resultados semelhantes à TFBM *sham*.

Desta forma, identificamos que as lacunas a respeito da energia ótima da TFBM permanecem e devem ser objeto de novas investigações.

Como parte do processo de formação acadêmica, apresento-lhes as atividades científicas desenvolvidas durante o período do doutorado:

FORMAÇÃO ACADÊMICA

1. Especialização em andamento em Fisioterapia em Terapia intensiva adulto, pediátrica e neonatal. (Carga Horária: 380h). Faculdade Inspirar, INSPIRAR, Brasil.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. **Linares, S. N.**; Beltrame, T.; Ferraresi, C.; Galdino, G. A. M.; Catai, A. M. Photobiomodulation effect on local hemoglobin concentration assessed by near-infrared spectroscopy in humans. *Lasers in Medical Science*, v. 35, p. 641-649, 2020.
2. Beltrame, T.; Gois, M. O.; Hoffmann, U.; Koschate, J.; Hughson, R. L.; Frade, M. C. M.; **Linares, S. N.**; Torres, R. S.; Catai, A. M. Relationship between maximal aerobic power with aerobic fitness as a function of signal-to-noise ratio. *Journal of applied physiology*, v. 129, p. 522-532, 2020.
3. Vanzella, L. M.; **Linares, S. N.**; Miranda, R. A. T.; Silva, A. K. F.; Christofaro, D. G. D.; Netto Jr, J.; Vanderlei, L. C. M. Effects of a new approach of aerobic interval training on cardiac autonomic modulation and cardiovascular parameters of metabolic syndrome subjects. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. x, p. x, 2019.
4. Miranda, R. A. T.; Lemes, Í. R.; Castrillón, C. I. M.; Vanderlei, F. M.; **Linares, S. N.**; Christofaro, D. G. D.; Pastre, C. M.; Netto Júnior, J. Lesões musculares em atletas do sexo masculino atendidos no Centro de Estudos e Atendimento em Fisioterapia de Presidente Prudente - SP. *Revista brasileira de ciências do esporte*, v. 40, p. 70-76, 2018.
5. Lemes, Í. R.; Turi-Lynch, B. C.; Cavero-Redondo, I.; **Linares, S. N.**; Monteiro, H. L. Aerobic training reduces blood pressure and waist circumference, and increases HDL-c in metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of the American Society of Hypertension*, v. 12, p. 580-588, 2018.
6. Silva, H. F.; Castrillón, C. I. M.; Figueiredo, M. P. F.; Vanderlei, F. M.; **Linares, S. N.**; Lemos, L. K.; Hidalgo, R. B. R.; Milanez, A. M.; Batista, N. P.; Pastre, C. M.; Netto Júnior, J. Comportamento da pressão arterial e composição

corporal após dois tipos de treinamentos periodizados em participantes com síndrome metabólica. Ensaio clínico controlado randomizado. *Colloquim vitae*, v. 9, p. 28-33, 2017.

7. Milanez, A. M.; **Linares, S. N.**; Miranda, R. A. T.; Castrillón, C. I. M.; Figueiredo, M. P. F.; Pastre, C. M.; Netto Júnior, J. Efeitos de 16 semanas de treinamento aeróbio intervalado periodizado sobre valores de glicemia em indivíduos com síndrome metabólica. *Colloquim vitae*, v. 9, p. 39-44, 2017.

MANUSCRITOS SUBMETIDOS

1. Energy-dependent effect of photobiomodulation therapy on hemodynamic and metabolic responses in adults with type 2 Diabetes Mellitus: a randomized, crossover, double-blind, sham-controlled trial

Stephanie Nogueira Linares; Thomas Beltrame; Gabriela Aguiar Mesquita Galdino; Maria Cecilia Moraes Frade; Juliana Cristina Milan-Mattos; Mariana de Oliveira Gois; Audrey Borghi-Silva; Priscila Faleiro de Biase; Fúlvia de Barros Manchado Gobatto; Vanderlei Salvador Bagnato; Nivaldo Antônio Parizoto; Cleber Ferraresi; Aparecida Maria Catai

Submetido a revista *Frontiers in Physiology* (JCR: 3.367)

2. Slower Walking Speed in Older Adults with Type 2 Diabetes: The Role of Peripheral Vascular Dysfunction.

Alessandro Domingues Heubel; Erika Zavaglia Kabbach; Guilherme Romano Migliato; Maria Isabella Santos Russo; **Stephanie Nogueira Linares**; Gustavo Muçouçah Sampaio Brandão; Meliza Goi Roscani; Audrey Borghi-Silva; Renata Gonçalves Mendes

Submetido a *Journal of Geriatric Physical Therapy* (JCR: 3.396)

MANUSCRITOS EM PREPARAÇÃO

1. Cerebral compliance in the type 2 diabetes mellitus and its relationship with autonomic nervous system: a cross-sectional study.

Gabriela Aguiar Mesquita Galdino; Silvia Cristina Garcia Moura-Tonello; **Stephanie Nogueira Linares**; Juliana Cristina Milan-Mattos; Deusdedit Lineu Spavieri Júnior; Sérgio Mascarenhas de Oliveira; Alberto Porta; Thomas Beltrame; Aparecida Maria Catai.

Será submetido a revista *Autonomic Neuroscience basic and clinical* (JCR: 2.247)

2. Effect of incremental exercise on cerebral oxygenation in cardiovascular and respiratory diseases: systematic review with meta-analysis.

Gabriela Aguiar Mesquita Galdino; Patrícia Rehder-Santos; **Stephanie Nogueira Linares**; Aparecida Maria Catai.

Será submetido a revista *Experimental Physiology* (JCR: 2.431)

3. Cardiorespiratory dynamic and its relationship with clinical parameters in type 2 diabetes patients

Mariana de Oliveira Gois; Thomas Beltrame; Maria Cecilia Moraes Frade; **Stephanie Nogueira Linares**; Ariane Petronilho; Aparecida Maria Catai.

Será submetido a revista *Experimental Physiology* (JCR: 2.431)

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. **Linares, S. N.**; Beltrame, T.; Ferraresi, C.; Galdino, G. A. M.; Milan-Mattos, J. C. M.; Frade, M. C. M.; Parizotto, N. A.; Borghi-Silva, A.; Gobatto, F. B. M.; Catai, A. M. Efeito agudo da fotobiomodulação na glicemia e lactacidemia de indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2. In: SOCESP, 2020, São Paulo. Suplemente da Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. São Paulo: Atha Comunicação e Editora, 2020. v. 30. p. 274-274.

2. Beltrame, T.; Pereira, L.; Gois, M.; Frade, M.; **Linares, S.**; Petronilho, A.; Hughson, R.; Catai, A.; Torres, R. Predicting VO₂max by machine learning models before volitional fatigue during incremental exercise. In: *ERS International Congress 2019. Clinical respiratory physiology, exercise and functional imaging*. v. 54. p. PA4132-4132.

3. Frade, M. C. M.; Beltrame, T.; Gois, M. O.; **Linares, S. N.**; Petronilho, A.; Sanches, G. L. A.; Catai, A. M. Relação entre a saúde cardiorrespiratória e a pontuação do questionário de Baecke de atividade física habitual em adultos jovens. In: 40º Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2019, São Paulo. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. São Paulo: Atha Comunicação e Editora, 2019. v. 29. p. 271-271.
4. Sanches, G. L. A.; Beltrame, T.; Gois, M. O.; Frade, M. C. M.; **Linares, S.N.**; Petronilho, A.; Catai, A. M. Relação entre a potência aeróbia e a taxa de oferta de oxigênio no pico do esforço. In: 40º Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2019, São Paulo. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. São Paulo: Atha Comunicação e Editora, 2019. v. 29. p. 272-272.
5. Galdino, G. A. M.; Moura-Tonello, S. C. G.; **Linares, S.N.**; Milan-Mattos, J. C. M.; Spavieri Júnior, D. L.; Frigieri, G.; Mascarenhas, S.; Beltrame, T.; Catai, A. M. Relação entre a pressão intracraniana não invasiva e modulação autonômica cardiovascular no diabetes mellitus tipo 2. In: 40º Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2019, São Paulo. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. São Paulo: Atha Comunicação e Editora, 2019. v. 29. p. 277-277.
6. Galdino, G. A. M. ; Moura-Tonello, S. C. G. ; **Linares, S.N.**; Milan-Mattos, J. C. M. ; Santos, P. R. ; Gois, M. O. ; Spavieri Júnior, D. L. ; Mascarenhas, S. ; Beltrame, T. ; Catai, A. M. . Noninvasive evaluation of intracranial pressure in type 2 diabetes mellitus. In: EuroPrevent, 2019, Lisbon. European Society of Cardiology. Lisbon: EuroPrevent, 2019. v. x. p. S81-S81.
7. Valverde, N. S.; **Linares, S.N.**; Milan-Mattos, J. C.; Marcondes, A. C. A.; Moura-Tonello, S. C. G.; Catai, A. M. Influência de um protocolo de exercício de carga constante na modulação autonômica cardíaca de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica e XI Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2019, São Carlos. XXVI CIC e XI CIDTI - Campus São Carlos. São Carlos: UFSCar, 2019. p. x-x.

8. Beltrame, T.; Koschate, J.; Hoffmann, U.; Gois, M.; Hughson, R.; Frade, M.; **Linares, S.N.**; Torres, R.; Catai, A. NIRS-derived Muscular Oxygen Uptake During Exercise in Humans. In: The Physiological Society, 2019, Aberdeen. Proc Physiol Soc. Aberdeen: The Physiological Society, 2019. v. 43. p. PC092-PC092.]
9. Sanches, G. L. A.; Beltrame, T.; Gois, M. O.; Frade, M. C. M.; **Linares, S.N.**; Petronilho, A.; Catai, A. M. Modelagem da aptidão aeróbia por técnicas de inteligência artificial durante exercício físico dinâmico em indivíduos saudáveis. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica e XI Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2019, São Carlos. XXVI Congresso de Iniciação Científica e XI Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. São Carlos: XXVI CIC e XI CIDTI, 2019. v. x. p. x-x.
10. **Linares, S.N.**; Beltrame, T.; Ferraresi, C.; Galdino, G. A. M.; Gois, M. O.; Catai, A. M. Efeitos da fotobiomodulação por LED na oxigenação muscular do antebraço em jovens saudáveis. In: XXXVIII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo - SOCESP, 2018, São Paulo. Reduzindo a mortalidade por doenças cardiovasculares. São Paulo: Atha Comunicação e Editora, 2018. v. 28. p. 280-280.
11. Dagostinho, D.B.B; Vanzella, L. M.; **Linares, S.N.**; Miranda, R. A. T.; Castrillón, C. I. M.; Takahashi, C.; Tirabassi, L.M.S.; Silva, A.K.L.; Vanderlei, L. C. M. Efeito do treinamento aeróbio intervalado periodizado na modulação autonômica de indivíduos com Síndrome Metabólica: análise pelo Plot de Poincaré. In: XXXVIII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo - SOCESP, 2018, São Paulo. Reduzindo a mortalidade por doenças cardiovasculares. São Paulo: Atha Comunicação e Editora, 2018. v. 28. p. 278-278.
12. Gois, M. O.; Simões, R. P.; Driusso, P.; Kunz, V.C.; Hirakawa, H. S.; **Linares, S.N.**; Porta, A.; Catai, A. M. Relação entre o espessamento da camada média-íntima carotídea e a sensibilidade barorreflexa em pacientes com doença arterial coronária e diabetes mellitus tipo 2. In: XXXVIII Congresso da Sociedade

de Cardiologia do Estado de São Paulo - SOCESP, 2017, São Paulo. Reduzindo a mortalidade por doenças cardiovasculares. São Paulo: SOCESP, 2017. v. 27. p. 288-288.

13. Linares, S.N.; Castrillón, C. I. M.; Miranda, R. A. T.; Vanderlei, F. M.; Figueiredo, M. P. F.; Mantovani Júnior, N.; Pastre, C. M.; Netto Júnior, J. Efeitos de um treinamento periodizado aeróbio intervalado versus funcional sobre pressão arterial na SMet. In: XXXVIII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo - SOCESP, 2017, São Paulo. Reduzindo a mortalidade por doenças cardiovasculares. São Paulo: SOCESP, 2017. v. 27. p. 342-342.

14. Silva, H. F.; **Linares, S. N.;** Custódio, A. J.; Pastre, C. M.; Netto Júnior, J. Efeitos de três tipos de treinamento periodizados nos parâmetros de massa magra e massa gorda em indivíduos com Síndrome Metabólica. In: 26º Congresso Pan-Americana de Medicina do Esporte, 2017, Rio de Janeiro. Anais do 29º Congresso Brasileiro de Medicina do Exercício e do Esporte. São Paulo: Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 2017. v. 23. p. 40-40.

15. Pizzo Júnior, E.; **Linares, S. N.;** Cavina, A. P. S.; Vanderlei, F. M.; Pastre, C. M.; Netto Júnior, J. Efeitos do treinamento resistido convencional e funcional na glicemia e triglicérides de indivíduos com Síndrome Metabólica. In: 26º Congresso Pan-Americano de Medicina do Esporte, 2017, Rio de Janeiro. Anais do 29º Congresso Brasileiro de Medicina do Exercício e do Esporte. São Paulo: Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 2017. v. 23. p. 41-41.

16. Monterani, J. S.; Custódio, A. J.; **Linares, S. N.;** Machado, A. F.; Vanderlei, F. M.; Netto Júnior, J.; Pastre, C. M. Efeitos do treinamento aeróbio intervalado nas variáveis antropométricas em indivíduos com Síndrome Metabólica. In: IV Congresso Sbrate 2017 e VIII Congresso Slard, 2017, Curitiba. Anais VI Congresso Sbrate e VII Congresso Slard, 2017, 2017. v. 1. p. 1-1.

17. Lima, H. P.; **Linares, S. N.;** Miranda, R. A. T.; Castrillón, C. I. M. Siqueira, M. S.; Vanderlei, F. M.; Netto Júnior, J.; Pastre, C. M. Treinamento resistido convencional vs funcional: efeitos sobre a perimetria na Síndrome Metabólica.

In: IV Congresso Sbrate 2017e VIII Congresso Slard, 2017, 2017, Curitiba. Anais VI Congresso Sbrate e VII Congresso Slard, 2017, 2017. v. 1. p. 1-1.

COLABORAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA

1. Avaliação da pressão intracraniana não invasiva no diabetes mellitus tipo II e sua relação com a modulação autonômica cardiovascular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Aparecida Maria Catai

Discente: Gabriela Aguiar Mesquita Galdino – mestrado PPG-Ft/UFSCar (2017)

2. Explorando Técnicas de Aprendizado de Máquina para a Modelagem do Sistema Aeróbio e suas Aplicações em Programas de Reabilitação Cardiorrespiratória.

Supervisão: Prof^a. Dr^a Aparecida Maria Catai e Prof^o. Dr. Ricardo da Silva Torres

Pesquisador: Dr. Thomas Beltrame – Pós-doutorado PPG-Ft/UFSCar (2017)

3. Alterações cardiorrespiratórias agudas e tardias em pacientes hospitalizados pela COVID-19: papel da função endotelial e saúde cardiovascular nos desfechos clínicos-funcionais e efeitos da telerreabilitação física

Docentes responsáveis: Prof^a. Dr^a Renata Gonçalves Mendes e Pro^o. Dr. Emmanuel Gomes Ciolac

Colaboradores: Alessandro Domingues Heubel (doutorado PPG-Ft/UFSCar); Ariane Aparecida Viana (doutorado UNESP/Bauru); Gustavo Yudi Orikassa de Oliveira (Fisioterapeuta) e Vanessa Teixeira do Amaral (mestrado UNESP/Bauru).

CO ORIENTAÇÃO EM PROJETOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

2019 – Projeto de iniciação científica da aluna *Natália Schichi Valverde*. “Análise da complexidade da modulação autonômica cardíaca durante e após exercício de carga constante em diabéticos do tipo 2.”

Bolsista PIBIC.

2020 – Projeto de iniciação científica do aluno *Luís Henrique Molina Gomes*.
“Influência da diabetes mellitus tipo 2 na deoxigenação muscular periférica durante protocolo de exercício de moderada intensidade.”

Bolsista PIBIC.

INDICADORES E INFORMAÇÕES ACADÊMICAS

- Currículo lattes

<http://lattes.cnpq.br/4807021719144918>

- ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-7427-0519>

- Publons

<https://publons.com/researcher/3038978/stephanie-nogueira-linares/>

2. CONTEXTUALIZAÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as principais causas de incapacidade prematura e são responsáveis por cerca de 36 milhões de mortes anuais no mundo. (1) Dentre essas doenças, destaca-se o Diabetes *Mellitus* (DM), o qual é caracterizado como um distúrbio metabólico crônico na qual o corpo não produz insulina ou não consegue utilizar adequadamente a insulina que produz. A DM é classificada como a sétima principal causa de morte mundial. (2) Estudos recentes reportam que há cerca de 463 milhões de adultos, com idade entre 20 e 79 anos, com a doença no mundo. (3) Ainda, a *Internacional Diabetes Federation* (IDF) estima que haverá 578 milhões de adultos com diabetes em 2030 e 700 milhões em 2045. (4)

Em âmbito nacional, segundo a *Sociedade Brasileira de Diabetes* e a *IDF*, o Brasil é o quinto país em termos de incidência de diabetes no mundo, com 16,8 milhões de doentes adultos, com idade entre 20 e 79 anos, perdendo apenas para a China, Índia, Estados Unidos e Paquistão (Tabela 1). Sendo esse, um número com potencial de crescimento, o que se torna preocupante, uma vez que as DCNT são responsáveis por mais de 70% das mortes mundiais. (5,6)

Tabela 1. Classificação dos dez principais países com maior número de pessoas com diabetes mellitus, com idade entre 20 e 79 anos, em 2019, 2030 e 2045.

2019			2030			2045		
Rank	País	Número de pessoas com diabetes (milhões)	Rank	País	Número de pessoas com diabetes (milhões)	Rank	País	Número de pessoas com diabetes (milhões)
1	China	116,4	1	China	140,5	1	China	147,2
2	Índia	77	2	Índia	101	2	Índia	134,2
3	EUA	31	3	EUA	34,4	3	Paquistão	37,1
4	Paquistão	19,4	4	Paquistão	26,2	4	EUA	36
5	Brasil	16,8	5	Brasil	21,5	5	Brasil	26
6	México	12,8	6	México	17,2	6	México	22,3
7	Indonésia	10,7	7	Indonésia	13,7	7	Egito	16,9
8	Alemanha	9,5	8	Egito	11,9	8	Indonésia	16,6
9	Egito	8,9	9	Bangladesh	11,4	9	Bangladesh	15
10	Bangladesh	8,4	10	Alemanha	10,1	10	Turquia	10,4

EUA: Estados Unidos da América.

Além disso, projeções para 2045 reportam que o Brasil continuará ocupando o quinto lugar na classificação geral de países, entretanto, de acordo com as estimativas, o número de pessoas com a doença será de aproximadamente 26 milhões.(7) Como consequência à situação atual, o número de internações por complicações causadas pela DM aumentou em proporções superiores às hospitalizações por todas as causas, impondo uma grande carga econômica aos sistemas de saúde, como visto na Tabela 2. (5,7,8)

Tabela 2. Classificação dos 10 principais países em relação aos gastos com a saúde de pessoas com diabetes, idade entre 20 e 79 anos, em 2019 (dados em bilhões de dólares).

Rank	País	Despesas (bilhões de dólares)
1	EUA	294,6
2	China	109
3	Brasil	52,3
4	Alemanha	43,8
5	Japão	23,5
6	México	17
7	França	16,9
8	Reino Unido	14,1
9	Canadá	12,3
10	Rússia	10,6

EUA: Estados Unidos da América.

O Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2), que representa cerca de 90 a 95% dos casos de DM nos dias atuais (7), é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia desencadeada por resistência da ação e/ou comprometimento da secreção de insulina secretada pelas células β do pâncreas. (7,9,10) A exposição crônica aos níveis elevados de glicose circulantes contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), obesidade e outras complicações (7) que impactam diretamente a capacidade funcional dos indivíduos com a doença. Sendo assim, o controle glicêmico nestes indivíduos é um dos pontos centrais para um tratamento efetivo.

Indivíduos com DM2 apresentam comprometimentos micro e macrovasculares que levam a diminuição da aptidão física e da potência aeróbia caracterizada pela lenta resposta do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$). (11) Muitos mecanismos podem explicar essas modificações vasculares no DM2 que prejudicam a resposta aeróbia, incluindo alterações estruturais, reduzido fluxo sanguíneo muscular e densidade capilar, irregularidade na difusão muscular do oxigênio e menor utilização do oxigênio mitocondrial. (12)

No intuito de minimizar os efeitos deletérios do DM2, a *Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes* (7) preconiza que mudanças no estilo de vida diminuem a incidência da DM2 em até 43%, por meio da redução direta dos níveis glicêmicos. (7,13) Dessa forma, a prática regular de exercício físico (EF) aparece no cenário como uma importante ferramenta. (14) Dentre as modalidades indicadas, o aeróbio (15) tem mostrado efeitos positivos para a melhora da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, melhora da aptidão cardiorrespiratória, controle da pressão arterial (16), melhora da função endotelial, melhora da capacidade funcional e qualidade de vida. (17–19).

Embora o EF seja uma alternativa cientificamente comprovada e imprescindível no tratamento da DM2, evidências apontam a necessidade de desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção direcionadas que possam potencializar os efeitos fisiológicos promovidos pelo EF, ou ainda, ser uma opção de terapia capaz de promover, de forma isolada, benefícios a saúde e auxiliar na melhora do metabolismo nesta população. (12) Neste sentido, a terapia por fotobiomodulação (TFBM) aparece no cenário como um importante recurso ergogênico, uma vez que essa terapia pode ser utilizada de forma única, ou combinada a alguma modalidade de EF.

Estudos apontam que a TFBM tem se mostrado benéfica para a população com DM2, pois o metabolismo aeróbio parece ser afetado pela terapia uma vez que a luz pode influenciar a função das mitocôndrias que utilizam o oxigênio (O_2) como aceptor final da cadeia transportadora de elétrons. (20–22) Desta forma, tem sido observado um efeito da TFBM no aumento da função mitocondrial (23), microcirculação (24,25), perfusão (26) e oxigenação tecidual (25,27), tolerância ao exercício e na diminuição da concentração de lactato, e dos marcadores de danos muscular. (12,20,28)

De maneira a facilitar a comparação entre diferentes estudos, a *World Association for Laser Therapy* (WALT) preconiza a padronização dos parâmetros e doses utilizadas nas terapias pela fotobiomodulação. Neste sentido, recomenda-se que novos estudos informem todos os parâmetros de irradiação utilizados, incluindo o comprimento de onda, fluência ou densidade de energia (J/cm^2), densidade de potência ou irradiância (W/cm^2), energia (J), frequência de emissão e área irradiada (cm^2). Assim, seria possível discutir, de maneira sistemática e reprodutível, os mecanismos fisiológicos que explicariam os efeitos observados após a aplicação de diferentes energias de irradiação da luz. Portanto, é necessário definir, como descrito na Tabela 3, alguns conceitos fundamentais de algumas grandezas físicas envolvidas nas terapias por fotobiomodulação:

Tabela 3. Definições da terapia por fotobiomodulação.

Potência	Define a taxa com que uma quantidade de energia é transmitida ao tecido e é medida em Watt (W) ou Joule por segundo (J/s).
Densidade de potência ou Irradiância	É a razão pela qual a potência é dissipada por área de tecido irradiado e é medida em Watt por centímetro quadrado (W/cm^2).
Energia	Traduz a quantidade de luz depositada no tecido alvo irradiado, a unidade de referência é o Joule (J). Esta grandeza é calculada multiplicando-se a potência de saída em Watts pelo tempo de terapia ou irradiação, em segundos (i.e., W.s).
Fluência ou Densidade de energia	Esta grandeza reflete a quantidade de energia aplicada no tecido com relação à área sobre a qual a energia se dissipa. Ou seja, traduz a quantidade de energia por unidade de área de tecido e é medida em Joule por centímetro quadrado (J/cm^2).

Como a TFBM é capaz de estimular o metabolismo mitocondrial, há um aumento da disponibilidade de energia para as células musculares. Esse processo ocorre devido à absorção de fótons pela enzima Citocromo C Oxidase (Cox) (20,29), localizada na cadeia transportadora de elétrons. Sendo assim, quanto maior a atividade da Cox, maior será o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e

maior será a energia disponível para a fosforilação oxidativa mitocondrial (29) (Figura 1).

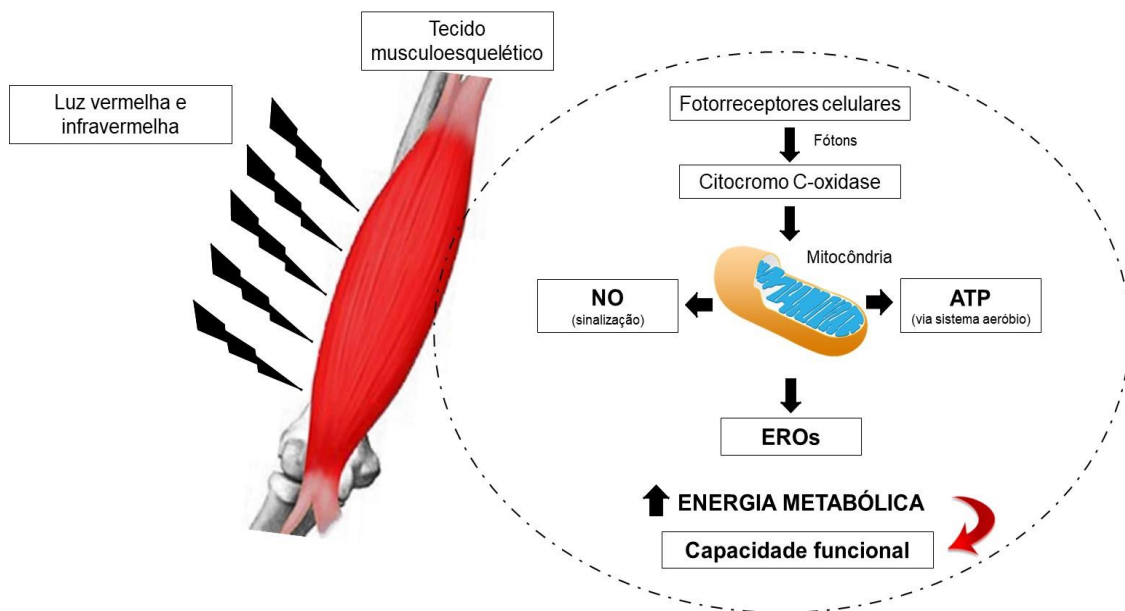


Figura 1. Mecanismo de ação da terapia por fotobiomodulação (TFBM) no tecido musculoesquelético. A TFBM estimula o metabolismo oxidativo mitocondrial devido a absorção das partículas de luz (fótons) pela enzima citocromo c oxidase (Cox). Assim, a luz absorvida no tecido interage com a mitocôndria celular, promovendo mudanças estruturais e metabólicas, como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), aumento da síntese de adenosina trifosfato (ATP) e síntese proteica.

Além da maior disponibilidade energética pela maior síntese da adenosina trifosfato (ATP), a TFBM parece elevar a liberação de óxido nítrico (NO). (29,30) Esse aumento da liberação de NO (31,32), por sua vez, pode estar associado a um aumento da oxigenação tecidual e concentração de hemoglobina que pode levar a melhora e aumento do metabolismo celular.(22,33–35) Além disso, quando a TFBM estimula a atividade da Cox, em células saudáveis, leva a um aumento breve e modesto na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). (36)

Com o objetivo de entender melhor como acontece essa interação entre a TFBM e o tecido muscular, desenvolvemos o nosso 1º estudo, intitulado: “Efeitos da fotobiomodulação na concentração de hemoglobina avaliada por meio da near-infrared spectroscopy em humanos”. (22) A população do estudo era composta por 12 jovens saudáveis e a TFBM consistia em um único LED, com comprimento de onda de 850 ± 20 nm, energia irradiada de 2 J e tempo de

aplicação de 40 segundos por intervenção, e o local de irradiação foi o terço proximal do músculo flexor ulnar do carpo. Nossos achados evidenciaram que a TFBM aumenta a concentração da oxi-miohemoglobina e miohemoglobina total, indicando um efeito da TFBM no equilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio, mais especificamente na oferta, mostrando o seu potencial efeito terapêutico.

Tais terapias utilizam equipamentos que emitem luz no tecido biológico alvo, excitando moléculas específicas e modificando as reações bioquímicas e fisiológicas das células irradiadas. (37) Entretanto, o uso da TFBM em indivíduos com DM2 compõem uma nova área de pesquisa cujos trabalhos ^{45,47-50} têm sido desenvolvidos com o intuito de esclarecer os reais efeitos da TFBM na melhora da resposta aeróbia e capacidade funcional. Assim, estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (12,33) investigou o potencial efeito terapêutico da FBM no DM2, utilizando duas energias (150J e 300J) e observou redução significativa da glicemia após exercício físico somente na energia de 150J.(33)

Com base nos estudos existentes observa-se que, energias ideais de FBM como intervenção no DM2 ainda não são completamente conhecidas.

Assim, surgiu o segundo questionamento da presente tese: *Quais seriam os efeitos isolados de diferentes energias da TFBM nos sistemas cardiovascular e/ou hemodinâmico e metabólico em indivíduos com DM2.*

Baseado neste questionamento, realizamos o 2^a estudo desta tese que versa sobre os efeitos dose-resposta da TFBM nas respostas hemodinâmicas e metabólicas. O estudo é intitulado: *“Efeito dose-resposta da terapia de fotobiomodulação nas respostas hemodinâmicas e metabólicas em adultos com Diabetes Mellitus tipo 2: um estudo randomizado, cruzado, duplo-cego e controlado por sham”*. Teve como objetivo verificar os efeitos agudos de diferentes energias (*sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J) nas respostas hemodinâmicas e metabólicas, como glicemia e lactato. Avaliamos essas respostas, em repouso, 1 minuto e 15 minutos após a aplicação da TFBM. Como resultado, identificamos que a TFBM promoveu efeitos principalmente nas variáveis débito cardíaco (\dot{Q}), resistência vascular periférica (RVP), frequência cardíaca (FC), glicemia e lactato quando aplicada em contato direto com a pele a um comprimento de onda de 850 ± 20 nm e potência de 75 mW.

Como explicitado anteriormente, as terapias por FBM podem causar modificações fisiológicas dos tecidos biológicos com consequente ação no metabolismo, proporcionando aumento da microcirculação sanguínea e regeneração tecidual (38–40). Com isso, os benefícios da TFBM na bioenergética muscular parecem favorecer a via metabólica aeróbia, contribuindo assim, para a maior disponibilidade de energia celular durante o exercício físico. Do ponto de vista clínico e prático, essas respostas poderiam ser de fundamental importância na reabilitação de indivíduos com DM2, no sentido de aumentar sua capacidade aeróbia (41), e conseqüentemente, a capacidade funcional e qualidade de vida. (42,43)

Como a TFBM parece influenciar diretamente os mecanismos da via aeróbia durante o exercício físico, a escolha por um protocolo de exercício que contemple essa característica é de fundamental importância. Por esta razão, a aplicação de um Protocolo Pseudorrandômico Binário (PRBS) parece adequada, já que este é capaz de estimar a resposta aeróbia de modo mais realista (44,45) e tem sido utilizado para investigação de doenças, como a DM2. (46,47). No PRBS, cada estágio oscila em relação ao tempo e as intensidades, que estão abaixo do limiar de anaerobiose ventilatório, o que garante que este exercício seja de intensidade moderada, de característica aeróbia e próxima às atividades desenvolvidas ao longo do dia a dia.

Pesquisas prévias (46,48–51) têm sido desenvolvidas com o objetivo de investigar efeitos da TFBM na melhora da resposta aeróbia, captação de oxigênio pulmonar, oxigenação muscular e na capacidade funcional do DM2. Assim, com esse propósito, estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (12,48) aplicou a TFBM bilateralmente nos músculos quadríceps femoral e tríceps sural, em pacientes com DM2, com duas energias (150J e 300J) previamente a um protocolo de exercício físico moderado de curta duração. Os autores observaram que a energia de 150 J foi capaz de promover redução significativa da glicemia após o exercício físico, e em relação aos ajustes cardiorrespiratórios, variáveis hemodinâmicas e lactato, durante a transição do exercício, não observaram modificação. Esses achados sugeriram que a TFBM associada ao exercício moderado tem potencial terapêutico no controle da glicemia do DM e que, mais estudos seriam necessários para estabelecer a janela terapêutica e a dose-resposta capaz de modificar de forma aguda os referidos ajustes fisiológicos.

Dessa forma, até o momento ainda são desconhecidos os efeitos terapêuticos agudos da FBM no DM2 por meio da avaliação integrada do sistema aeróbio e da energia ótima para esta população. Ainda, estratégias de tratamento com base no aumento e melhora da capacidade funcional dos indivíduos com DM2 são de grande importância visto que a intolerância à atividade física reduz significativamente a qualidade de vida (49) e estão relacionadas ao aumento do risco cardiovascular dessa população. (33,52) Desta forma, estratégias com foco na melhora do metabolismo aeróbio são primordiais para o tratamento do DM2. (50,51)

Com base nos conhecimentos desses benefícios mediados pela TFBM, surgiu um terceiro questionamento desta tese: *a terapia por fotobiomodulação com diferentes energias, aplicada previamente a realização de um protocolo de exercício de intensidade moderada poderia potencializar as respostas hemodinâmicas e os ajustes cardiorrespiratórios nesta população? E ainda, seria possível estabelecer uma janela terapêutica e dose-resposta capaz de modificar de forma aguda as referidas respostas e ajustes fisiológicos?*

Desta forma, elaboramos o 3º estudo desta tese, intitulado: *“Efeito dose-resposta aguda da terapia por fotobiomodulação na dinâmica cardiorrespiratória e deoxigenação muscular em adultos com Diabetes Mellitus tipo 2: um estudo randomizado, cruzado, duplo-cego e controlado por sham”* e teve como objetivo avaliar os efeitos da dose-resposta aguda da TFBM associada a exercício de moderada intensidade, composto por protocolo de carga constante (PCC) seguido por protocolo pseudorrandômico binário (PRBS) com duração de 23 minutos, nas respostas hemodinâmicas e ajustes cardiorrespiratórios. Como resultados, identificamos que a TFBM nas condições estudadas, não potencializou as respostas hemodinâmicas e cardiorrespiratórios, com exceção do DC, em indivíduos com DM2.

Os três estudos desenvolvidos estão apresentados nas próximas sessões desta tese, no formato de um artigo publicado e 2 manuscritos (um submetido e outro em preparação), traduzidos para a língua portuguesa e com a inclusão de ilustrações.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malta DC, Silva Jr JB da. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão . Vol. 22, Epidemiologia e Serviços de Saúde . scielo ; 2013. p. 151–64.
2. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. International Diabetes Federation. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>.
4. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. Diabetes Res Clin Pract. 2018 Apr;138:271–81.
5. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract [Internet]. 2019;157:107843. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822719312306>
6. Flor LS, Campos MR. Prevalência de diabetes mellitus e fatores associados na população adulta brasileira: evidências de um inquérito de base populacional . Vol. 20, Revista Brasileira de Epidemiologia . scielo ; 2017. p. 16–29.
7. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. São Paulo: Editora Clannad. 2019.
8. Williams R, Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Basit A, Besançon S, et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract. 2020 Apr;162:108072.
9. de Moura-Tonello SCG, Porta A, Marchi A, de Almeida Fagundes A, Francisco C de O, Rehder-Santos P, et al. Cardiovascular Variability Analysis and Baroreflex Estimation in Patients with Type 2 Diabetes in Absence of Any Manifest Neuropathy. PLoS One. 2016;11(3):e0148903.
10. Francisco CO, Catai AM, Moura-Tonello SCG, Lopes SLB, Benze BG, Del Vale AM, et al. Cardiorespiratory fitness, pulmonary function and C-reactive protein levels in nonsmoking individuals with diabetes. Brazilian J Med Biol Res [Internet]. 2014;47:426–31. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2014000500426&nrm=iso
11. Bauer T, Reusch J, Levi M, Regensteiner J. Skeletal Muscle Deoxygenation After the Onset of Moderate Exercise Suggests Slowed

- Microvascular Blood Flow Kinetics in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:2880–5.
12. Francisco C de O, Beltrame T, Ferraresi C, Parizotto NA, Bagnato VS, Borghi Silva A, et al. Evaluation of acute effect of light-emitting diode (LED) phototherapy on muscle deoxygenation and pulmonary oxygen uptake kinetics in patients with diabetes mellitus: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2015 Dec;16:572.
 13. Lindstrom J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemio K, et al. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* (London, England). 2006 Nov;368(9548):1673–9.
 14. O'Hagan C, De Vito G, Boreham CAG. Exercise prescription in the treatment of type 2 diabetes mellitus : current practices, existing guidelines and future directions. *Sports Med*. 2013 Jan;43(1):39–49.
 15. Ciolac EG, Guimarães GV. Exercício físico e síndrome metabólica . Vol. 10, *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* . scielo ; 2004. p. 319–24.
 16. Lemes ÍR, Turi-Lynch BC, Cavero-Redondo I, Linares SN, Monteiro HL. Aerobic training reduces blood pressure and waist circumference and increases HDL-c in metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Soc Hypertens*. 2018 Aug;12(8):580–8.
 17. Marcus RL, Smith S, Morrell G, Addison O, Dibble LE, Wahoff-Stice D, et al. Comparison of combined aerobic and high-force eccentric resistance exercise with aerobic exercise only for people with type 2 diabetes mellitus. *Phys Ther*. 2008 Nov;88(11):1345–54.
 18. Reid RD, Tulloch HE, Sigal RJ, Kenny GP, Fortier M, McDonnell L, et al. Effects of aerobic exercise, resistance exercise or both, on patient-reported health status and well-being in type 2 diabetes mellitus: a randomised trial. *Diabetologia*. 2010 Apr;53(4):632–40.
 19. Gulve EA. Exercise and glycemic control in diabetes: benefits, challenges, and adjustments to pharmacotherapy. *Phys Ther*. 2008 Nov;88(11):1297–321.
 20. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang Y-Y, de Sousa MVP, Bagnato VS, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol*. 2015;91(2):411–6.
 21. Ferraresi C, Beltrame T, Fabrizzi F, do Nascimento ESP, Karsten M, Francisco C de O, et al. Muscular pre-conditioning using light-emitting diode therapy (LEDT) for high-intensity exercise: a randomized double-blind placebo-controlled trial with a single elite runner. *Physiother Theory Pract*. 2015 Jul;31(5):354–61.
 22. Linares SN, Beltrame T, Ferraresi C, Galdino GAM, Catai AM. Photobiomodulation effect on local hemoglobin concentration assessed by near-infrared spectroscopy in humans. *Lasers Med Sci*. 2020

- Apr;35(3):641–9.
23. Baroni BM, Rodrigues R, Freire BB, Franke R de A, Geremia JM, Vaz MA. Effect of low-level laser therapy on muscle adaptation to knee extensor eccentric training. *Eur J Appl Physiol*. 2015 Mar;115(3):639–47.
 24. Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med*. 2000;27(5):427–37.
 25. Mak MCH, Cheing GLY. Immediate effects of monochromatic infrared energy on microcirculation in healthy subjects. *Photomed Laser Surg*. 2012 Apr;30(4):193–9.
 26. Klebanov GI, Kreinina M V, Poltanov EA, Khristoforova T V, Vladimirov YA. Mechanism of Therapeutic Effect of Low-Intensity Infrared Laser Radiation. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2001;131(3):239–41. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1017643230376>
 27. Ihsan FRM. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*. 2005 Jun;23(3):289–94.
 28. He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*. 2001 Apr;50(4):817–23.
 29. Lanferdini FJ, Krüger RL, Baroni BM, Lazzari C, Figueiredo P, Reischak-Oliveira A, et al. Low-level laser therapy improves the VO₂ kinetics in competitive cyclists. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2018;33(3):453–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2347-y>
 30. Ferraresi C, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? *J Biophotonics*. 2016 Dec;9(11–12):1273–99.
 31. De Moraes TF, Filho JCC, Oishi JC, Almeida-Lopes L, Parizotto NA, Rodrigues GJ. Energy-dependent effect trial of photobiomodulation on blood pressure in hypertensive rats. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2020;35(5):1041–6. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02883-5>
 32. Agrawal T, Gupta GK, Rai V, Carroll JD, Hamblin MR. Pre-conditioning with low-level laser (light) therapy: light before the storm. *Dose Response*. 2014 Dec;12(4):619–49.
 33. Francisco C de O, Beltrame T, Hughson RL, Milan-Mattos JC, Ferrol-Fabricio AM, Galvão Benze B, et al. Effects of light-emitting diode therapy (LEDT) on cardiopulmonary and hemodynamic adjustments during aerobic exercise and glucose levels in patients with diabetes mellitus: A randomized, crossover, double-blind and placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med*. 2019 Feb;42:178–83.
 34. Silva G, Ferraresi C, de Almeida RT, Motta ML, Paixão T, Ottone VO, et al. Infrared photobiomodulation (PBM) therapy improves glucose metabolism

- and intracellular insulin pathway in adipose tissue of high-fat fed mice. *Lasers Med Sci.* 2018 Apr;33(3):559–71.
35. Wang X, Tian F, Soni SS, Gonzalez-Lima F, Liu H. Interplay between up-regulation of cytochrome-c-oxidase and hemoglobin oxygenation induced by near-infrared laser. *Sci Rep [Internet].* 2016;6(1):30540. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep30540>
 36. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys [Internet].* 2017/05/19. 2017;4(3):337–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28748217>
 37. Ferraresi C, de Sousa MVP, Huang Y-Y, Bagnato VS, Parizotto NA, Hamblin MR. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci.* 2015 May;30(4):1259–67.
 38. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD, Costa LOP, Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2018 Jan;33(1):181–214.
 39. Ferraresi C, de Brito Oliveira T, de Oliveira Zafalon L, de Menezes Reiff RB, Baldissera V, de Andrade Perez SE, et al. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. *Lasers Med Sci.* 2011 May;26(3):349–58.
 40. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med [Internet].* 2012 Nov 1;1(4):267–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23626925>
 41. Vieira WH de B, Ferraresi C, Perez SE de A, Baldissera V, Parizotto NA. Effects of low-level laser therapy (808 nm) on isokinetic muscle performance of young women submitted to endurance training: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012 Mar;27(2):497–504.
 42. Alexander NB, Dengel DR, Olson RJ, Krajewski KM. Oxygen-uptake (VO₂) kinetics and functional mobility performance in impaired older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003 Aug;58(8):734–9.
 43. Beltrame T, Hughson RL. Linear and non-linear contributions to oxygen transport and utilization during moderate random exercise in humans. *Exp Physiol [Internet].* 2017;102(5):563–77. Available from: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/EP086145>
 44. Beltrame T, Hughson RL. Mean Normalized Gain: A New Method for the Assessment of the Aerobic System Temporal Dynamics during Randomly Varying Exercise in Humans. *Front Physiol.* 2017;8:504.
 45. Beltrame T, Ferraresi C, Parizotto NA, Bagnato VS, Hughson RL. Light-emitting diode therapy (photobiomodulation) effects on oxygen uptake and

- cardiac output dynamics during moderate exercise transitions: a randomized, crossover, double-blind, and placebo-controlled study. *Lasers Med Sci.* 2018 Jul;33(5):1065–71.
46. Koschate J, Drescher U, Brinkmann C, Baum K, Schiffer T, Latsch J, et al. Faster heart rate and muscular oxygen uptake kinetics in type 2 diabetes patients following endurance training. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab.* 2016 Nov;41(11):1146–54.
 47. Koschate J, Drescher U, Baum K, Brinkmann C, Schiffer T, Latsch J, et al. Heart Rate and Oxygen Uptake Kinetics in Type 2 Diabetes Patients - A Pilot Study on the Influence of Cardiovascular Medication on Regulatory Processes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2017 May;125(5):275–81.
 48. de Oliveira Francisco C, Beltrame T, Hughson R, Milan-Mattos J, Ferroli-Fabricio A, Benze B, et al. Cardiopulmonary and Hemodynamic Adjustments During Aerobic Exercise After Light-Emitting Diode Therapy: A Comparison Between Healthy and Type 2 Diabetes Mellitus. *Chest* [Internet]. 2017;152(4, Supplement):A978. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001236921732531X>
 49. Albright A, Franz M, Hornsby G, Kriska A, Marrero D, Ullrich I, et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 Jul;32(7):1345–60.
 50. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Apr;212(2):167–78.
 51. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004 Feb;53 Suppl 1:S110-8.
 52. Milan-Mattos JC, de Oliveira Francisco C, Ferroli-Fabricao AM, Minatel V, Marcondes ACA, Porta A, et al. Acute effect of photobiomodulation using light-emitting diodes (LEDs) on baroreflex sensitivity during and after constant loading exercise in patients with type 2 diabetes mellitus. *Lasers Med Sci.* 2020 Mar;35(2):329–36.

4. ESTUDO 1

(versão em português com detalhamentos e inclusão de ilustrações)

“Efeitos da fotobiomodulação nas concentrações de hemoglobina local avaliada por meio da espectroscopia de infravermelho próximo em humanos”¹

Stephanie Nogueira Linares, Thomas Beltrame, Cleber Ferraresi, Gabriela Aguiar Mesquita Galdino, Aparecida Maria Catai

¹ Publicado no periódico ***Lasers in Medical Science*** em abril de 2020; volume 35(3), páginas 641-649. Epub agosto de 2019.
(DOI: 10.1007/s10103-019-02861-x)

4.1 INTRODUÇÃO

Com base na oxidação de compostos de alta energia, as mitocôndrias desempenham um papel fundamental na função e manutenção da homeostase celular por meio da ressíntese de trifosfato de adenosina (ATP).(1) A exposição de tecidos biológicos à luzes terapêuticas, ou terapia de fotobiomodulação (TFBM), pode estimular a função mitocondrial, aumentando sua atividade eletroquímica, resultando em uma maior taxa de ressíntese de ATP.(2–5)

O principal mecanismo de ação da TFBM para estimular a mitocôndria e a ressíntese de ATP está relacionado ao aumento da atividade da Citocromo c oxidase (Cox, enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial). (6–8) Uma maior capacidade de oxidação da Cox, promovida pela TFBM, pode levar a alterações no consumo de oxigênio intracelular e na produção de energia por meio da fosforilação oxidativa mitocondrial.(6) Portanto, modificações na capacidade oxidativa da Cox resultariam em alterações no equilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio. (9,10)

Além de seus efeitos na Cox, a TFBM também parece contribuir para uma melhor microcirculação sanguínea. (11–13) Esse aumento na oferta de oxigênio, pela melhora da perfusão, pode influenciar a capacidade do tecido musculoesquelético em realizar exercícios por meio de diversos mecanismos de ação. (1,8,14) Além disso, estudos sugerem que TFBM é de grande importância para restaurar a capacidade funcional de uma população doente, aumentando a oferta local de oxigênio. (15,16)

Independentemente dos efeitos da TFBM no consumo de oxigênio muscular (ou seja, ação na Cox) ou oferta (ou seja, fluxo sanguíneo), as respostas do metabolismo aeróbico, como um produto do consumo e oferta de oxigênio (17), devem ser influenciadas pela TFBM. No princípio de Fick (18), durante o repouso onde a captação de oxigênio é constante, um maior consumo de oxigênio promovida pelo efeito da TFBM sobre Cox deveria aumentar a extração de oxigênio da microcirculação local. Por outro lado, também durante o repouso, um maior aporte de oxigênio causado pela vasodilatação promovida pela TFBM deve aumentar a extração de oxigênio da circulação local. (19,20) Mais uma possibilidade é aumentar o consumo e a oferta de oxigênio na mesma proporção, onde nenhuma alteração promovida pela TFBM será possível de ser

observada experimentalmente no balanço de oxigênio durante uma condição de repouso.

Considerando tecnologias, como *near-infrared spectroscopy* (NIRS), informações podem ser obtidas sobre o equilíbrio entre a oferta e consumo de oxigênio periférico avaliando as concentrações locais de oxi- $[O_2Hb]$ e deoxi-miohemoglobina $[HHb]$. (16) Portanto, a NIRS pode ser usada para estudar quais são os efeitos agudos da TFBM no manuseio de oxigênio local “in vivo”. A NIRS tem sido utilizada para avaliar a oxigenação tecidual (saturação / perfusão), o consumo local de O_2 e o fluxo sanguíneo em diferentes tecidos humanos, incluindo cérebro e músculo esquelético. (1) A NIRS pode penetrar nos tecidos biológicos com menos dispersão e absorção do que a luz visível, oferecendo vantagens para medições quantitativas. Em sua forma mais simples, um dispositivo NIRS consiste em uma fonte de luz que emite 2 ou mais comprimentos de onda de luz na faixa do infravermelho próximo (650-1000 nm) no tecido de interesse e um detector colocado a uma distância conhecida da fonte. (16,21) A absorvância da luz infravermelha próxima da região do cromóforo da hemoglobina (Hb) difere dependendo se a Hb está oxigenada (transportando oxigênio) ou deoxigenada (não transportando oxigênio). (21)

A NIRS é um método não invasivo que nos permite estudar a oferta e o consumo local de O_2 in vivo. (22) Essa tecnologia fornece os meios para a investigação de alguns possíveis benefícios decorrentes de diferentes tipos de intervenções. (16,23)

Sendo assim, o principal objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos agudos da TFBM, por meio da *near-infrared spectroscopy*, na oferta e consumo de O_2 em humanos. A principal hipótese deste estudo é que a TFBM influencia o equilíbrio de oxigênio no músculo.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo e declaração de ética

Trata-se de um ensaio clínico cego, *sham* controlado envolvendo homens jovens saudáveis que seguiu as diretrizes do CONSORT 2010.(24) Os dados foram coletados em setembro de 2017 e foi realizado de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque (1964), aprovado pelo Comitê de Ética

em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, sob número de protocolo 13573013.1.0000.5504 e realizado de acordo com as normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos (Resolução 466 de 2012, Conselho Nacional de Saúde). Após concordarem em participar do estudo, todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC, ID RBR-8r23ds, em 02/06/2019), conforme a Plataforma Internacional de Registro de Ensaios Clínicos da OMS.

Doze jovens saudáveis ($28 \pm 3,1$ anos, peso corporal de $81 \pm 26,4$ kg e altura de $1,75 \pm 0,49$ cm) foram incluídos no estudo. Os participantes foram inicialmente recrutados por meio de comunicação pessoal ou por meio de folders espalhados pelo campus da Universidade, conforme aprovado pelo comitê de ética local. Uma vez recrutados, os participantes seguiram os procedimentos éticos descritos acima e, em seguida, sua massa corporal e estatura foram medidos. Apenas participantes com IMC inferior a 35 kg/m^2 foram incluídos no estudo. (25) Os critérios de exclusão foram: diagnóstico de distúrbio cardiovascular e respiratório; ocorrência de lesão cutânea ou infecção local na região do antebraço; história de lesão muscular esquelética nos últimos seis meses; e doença articular crônica. Fumantes, alcoolistas e usuários de drogas ilícitas também foram excluídos deste estudo. Entretanto, nenhum participante foi excluído por algum desses critérios.

Os efeitos da TFBM foram testados de forma aleatória no antebraço esquerdo e/ou direito. Um pesquisador foi responsável pelo procedimento de randomização e controle do dispositivo de FBM. Conforme descrito na Figura 1, após ~ 20 minutos de repouso para aquecer o dispositivo NIRS, a terapia de fotobiomodulação por diodo emissor de luz (LED) foi ligada por 40 s em quatro intervenções diferentes (I_1 , I_2 , I_3 e I_4) separadas por 3 min de intervalo entre elas. Como os voluntários não sabiam quando o dispositivo LED era ligado ou desligado, a condição “*Sham*” foi considerada como o período anterior a TFBM.

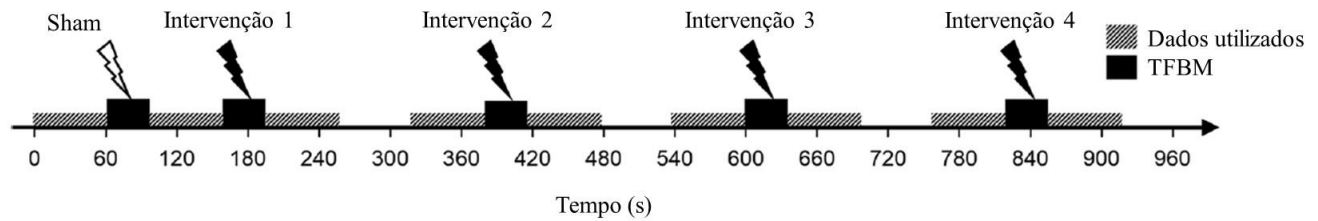


Figura 1. Desenho experimental. Os participantes receberam 40 segundos de terapia por fotobiomodulação (TFBM) por um diodo emissor de luz (LED) em 4 intervenções diferentes separadas por 3 minutos. O *sham* foi considerado como o período anterior à primeira aplicação de LED. Os dados usados para avaliar os efeitos da TFBM foram relacionados ao minuto antes (ou seja, Pré) e ao minuto após (ou seja, Pós) cada uma das intervenções e o *sham*.

Terapia de fotobiomodulação

O dispositivo de TFBM consistia em um único LED, conectado a um protótipo não comercial, desenvolvido por duas universidades brasileiras, a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e a Universidade de São Paulo (USP -IFSC). Os participantes permaneciam sentados em repouso e com os braços apoiados na mesa, na altura do coração. O probe do LED foi colocado em contato direto com o terço proximal do músculo flexor ulnar do carpo. O ventre muscular foi localizado pela anatomia palpatória durante um teste de contração voluntária máxima onde era solicitado que o voluntário realiza-se a flexão do punho com adução (no sentido ulnar).

Um dispositivo protótipo (Figura 2) foi construído para segurar o LED simultaneamente com os cabos da NIRS. Conforme mostrado na Figura 2B, o dispositivo de LED consistia em um probe único de LED, localizada a 1,5 e 2 cm de distância da primeira e da segunda fibra óptica da fonte de luz (transmissores), respectivamente; e 1,5 cm da fibra óptica do receptor de luz. Os parâmetros da TFBM são apresentados na Tabela 1. Para garantir que a FBM estava entregando a quantidade correta de energia óptica ao tecido, a potência óptica da luz emitida pelo LED foi medida antes dos experimentos por um medidor de energia óptica (PM100D Thorlabs®, Newton, New Jersey, EUA) conectado a um sensor de luz S130C (área de 0,70 cm²).

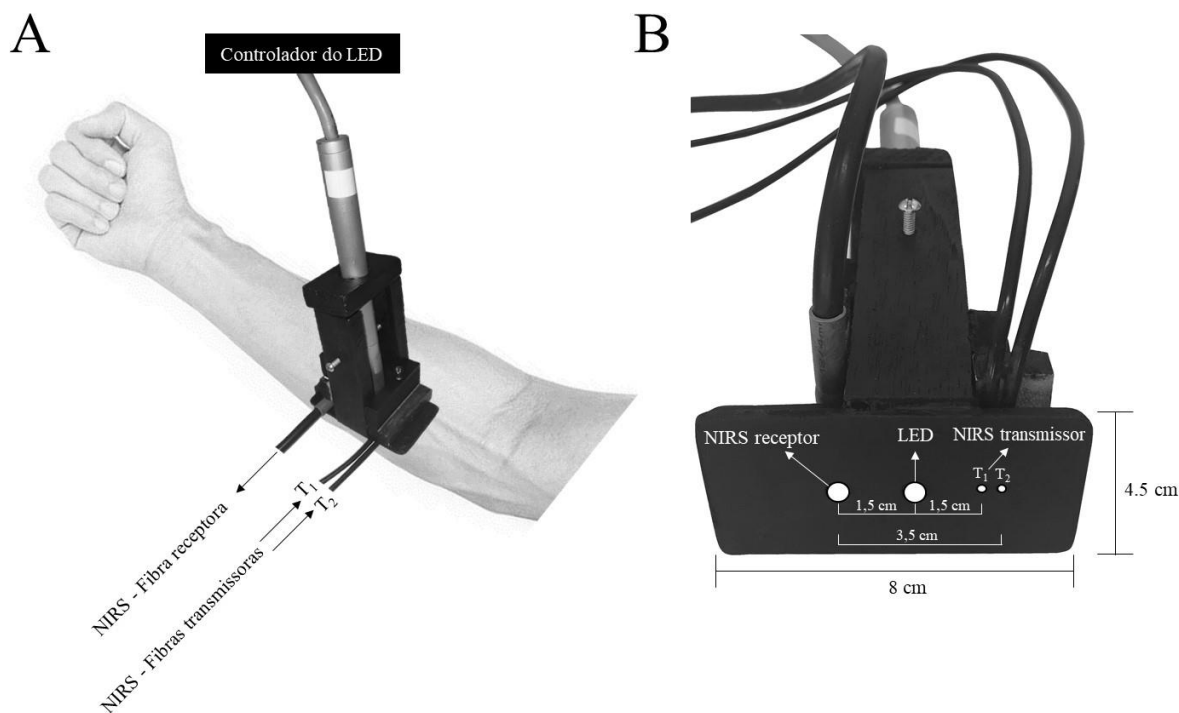


Figura 2. A: Posicionamento do dispositivo de diodo emissor de luz (LED) conectado ao seu controlador e as fibras de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) (duas fontes de luz e um receptor) no terço proximal do músculo flexor ulnar do carpo. Um suporte foi construído para colocar o dispositivo LED a distâncias iguais, durante o teste. B: Vista inferior do suporte (4,5 x 8 cm) com o dispositivo LED e as fibras ópticas NIRS. As fibras NIRS estavam a cerca de 1,5 cm de distância do LED.

Tabela 1. Parâmetros da terapia de fotobiomodulação (TFBM) e região da irradiação do LED no corpo

Número de LEDs: 1 (infravermelho)
Comprimento de onda: 850 ± 20 nm
Frequência: saída contínua
Saída ótica: 50 mW
Tamanho do LED: 0.2 cm^2
Densidade de potência: 250 mW/cm^2
Tempo de intervenção: 40 s
Energia: 2 J
Densidade de energia por LED em 40 s: 10 J/cm^2
Energia total fornecida por grupo muscular: 4 (intervenções) x 2 J (8 J)
Grupo muscular: 1/3 proximal do músculo flexor ulnar do carpo
Energia total fornecida por membro: 8 J
Modo de aplicação: Em contato direto com a pele

nm: nanômetros; **mW:** milliwatts; **cm²:** centímetros ao quadrado; **mW/cm²:** milliwatts por centímetro ao quadrado; **s:** segundos; **J:** joules; **J/cm²:** joules por centímetro quadrado.

Near-infrared spectroscopy (NIRS)

Após o posicionamento do dispositivo e fixação com fita hipoalergênica, o antebraço foi cuidadosamente envolto por um tecido (pano) escuro para evitar interferência da luz ambiente nos sinais da NIRS. Um dispositivo NIRS de duas distâncias, de ondas contínuas e dois canais (Oxymon System, Artinis Medical Systems, Holanda) foi utilizado para avaliar as mudanças relativas na dinâmica das concentrações de $[O_2Hb]$ e $[HHb]$ (expresso em μM) do músculo flexor ulnar do carpo. A taxa de amostragem foi de 10 Hz. O dispositivo NIRS foi conectado a um computador pessoal para armazenamento de dados e exibição *on-line*. Cada fibra transmissora de luz NIRS (denominada T_1 e T_2 na Figura 2) consistia em dois LEDs operando com um comprimento de onda de 844 e 762 nm e uma distância de entrada/saída de luz de 30 (T_1) e 35 (T_2) mm (Figura 2). As fibras ópticas da NIRS foram colocadas na área-alvo e o aparelho aquecido por pelo menos 20 min antes da coleta de dados. Por análise *post hoc*, os sinais NIRS nos níveis de T_1 e T_2 foram correlacionados durante todo o teste para cada participante. Uma análise do coeficiente de correlação de *Pearson* entre os sinais da NIRS medidos em T_1 e profundidade de penetração de T_2 demonstrou um coeficiente de $98 \pm 0\%$ com $p < 0,001 \pm 0,000\%$ para $[O_2Hb]$, e $97 \pm 2\%$ com $p < 0,001 \pm 0,000\%$ para $[HHb]$. Portanto, para melhorar ainda mais a relação sinal-ruído, a concentração final de miohemoglobina foi tomada como a média (ou seja, \bar{x}) do sinal ($[O_2Hb]$ ou $[HHb]$) medido nas distâncias de T_1 e T_2 , portanto, a unidade de medida final considerada foi $\bar{x}\mu M$.

Análise de dados

Os dados da NIRS foram registrados *on-line*, a 10 Hz, pelo *software Oxymon System (Artinis Medical Systems, Holanda)*. Após a coleta de dados, os sinais foram reduzidos e exportados a 1 Hz por interpolação linear e, em seguida, conforme descrito acima, a média da ($[O_2Hb]$ e $[HHb]$) medido em T_1 e T_2 foram calculadas. Posteriormente, as concentrações de miohemoglobina total ($[tHb]$) e a diferença de oxi-deoxi miohemoglobina ($[dHb]$) foram calculadas como a soma e a diferença entre $[O_2Hb]$ e $[HHb]$, respectivamente. Conforme descrito na Figura 1, as médias de 1 minuto de cada variável (ou seja, $[O_2Hb]$, $[HHb]$,

[*tHb*] e [*dHb*]) foram calculadas em dois momentos diferentes, antes (*Pré*) e depois (*Pós*) de cada intervenção (*sham*, I_1 , I_2 , I_3 and I_4).

Em seguida, foi calculada a diferença entre *Pós* e *Pré* (delta, Δ) para todas as variáveis em cada intervenção. Considerada uma limitação metodológica, o dispositivo NIRS usado neste estudo mede apenas as mudanças relativas nas concentrações, uma vez que os dados absolutos variam aleatoriamente entre os participantes. Portanto, para uma melhor visualização dos dados, os gráficos para a comparação entre “*Pré*” e o “*Pós*” foram plotados como mudanças em relação ao momento “*Pré*” (ou seja, Δ).

Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm DP, e a normalidade foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Considerando o tamanho da amostra, o ruído esperado associado a NIRS (16,26), e o fato da maioria dos dados estarem normalmente distribuídos, assumimos uma distribuição normal e apenas testes estatísticos paramétricos foram usados.(27)

Antes de usar a análise de variância (ANOVA), as possíveis influências dos fatores de confusão (ou seja, efeito *sham* e o possível efeito de resíduo entre intervenções) foram testadas separadamente, a priori, uma vez que esses fatores podem induzir a erros do tipo I, o teste de hipótese principal (Efeito TFBM). Portanto, as hipóteses secundárias foram testadas antes do teste da hipótese principal. A primeira hipótese secundária era que as variáveis mudariam devido ao efeito *sham*. A razão para testar essa hipótese secundária foi que os sinais da NIRS podem mudar espontaneamente ao longo do experimento sem a influência da TFBM. Para testar essa hipótese, foi utilizado um teste *t* pareado para comparar as variáveis entre os momentos “*Pré*” e “*Pós*” na intervenção “*Sham*” (use a Figura 1 como referência).

A hipótese secundária era que os valores Δ (isto é, diferença entre “*Pós*” e o “*Pré*”) eram diferentes entre as intervenções sob os efeitos da TFBM (I_1 , I_2 , I_3 e I_4). A razão para testar essa hipótese foi garantir que a magnitude das mudanças promovidas pela TFBM, se presente, não estariam sob a influência do efeito de possível resíduo entre intervenções entre I_1 , I_2 , I_3 e I_4 (Figura 1). Esta

hipótese foi testada comparando os valores de Δ de cada variável entre as intervenções I_1 , I_2 , I_3 e I_4 usando análise de variância, ANOVA, *one way* de medidas repetidas. Além disso, para todas as variáveis dependentes, a comparação do momento “Pré” entre as intervenções I_1 , I_2 , I_3 e I_4 também foram testadas por ANOVA a fim de verificar se os sinais retornaram aos seus valores basais antes da TFBM (sem um efeito do carreamento entre as intervenções).

Como análise estatística final, se a hipótese nula de ambos os fatores de confusão (*sham* e efeito de resíduo entre intervenções) fosse confirmada, uma ANOVA *two way* de medidas repetidas seria utilizada para verificar o efeito principal da TFBM e a presença do efeito de interação entre as intervenções (I_1 , I_2 , I_3 e I_4) e momentos (*Pré* ou *Pós*). Se fossem identificadas diferenças, o teste *Student-Newman-Keuls* era usado para análise *post-hoc*. O *power* do teste estatística ANOVA *two way* de medidas repetidas também foi relatado para a [O_2Hb] (como a variável principal).

Para todos os testes estatísticos, um valor de $p < 0,05$ foi considerado como diferença estatisticamente significativa entre as médias. As análises estatísticas e gráficos foram realizados no *software* SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, Califórnia, EUA).

4.3 RESULTADOS

Hipóteses secundárias: *sham* e efeito de resíduo entre intervenções

Conforme descrito na seção “Análise estatística”, duas hipóteses secundárias foram testadas inicialmente. Essas hipóteses secundárias foram usadas para verificar as influências do *sham* e o efeito de efeito de resíduo entre intervenções nas respostas da NIRS. Na intervenção *sham*, não foram encontradas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os momentos *Pré* e *Pós* para nenhuma variável (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações da oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$), deoxi-miohemoglobina ($[HHb]$), miohemoglobina total ($[tHb]$) e diferença de miohemoglobina ($[dHb]$) antes (*Pré*) e após (*Pós*) a intervenção *sham*. Os valores delta (Δ) foram calculados como a diferença entre os momentos *Pós* e *Pré*.

Variável	Momentos	Sham
$[O_2Hb]$ ($\bar{x}\mu M$)	<i>Pré</i>	4.28 ± 3.97
	<i>Pós</i>	4.90 ± 5.03
	Δ	0.61 ± 2.03
$[HHb]$ ($\bar{x}\mu M$)	<i>Pré</i>	-0.29 ± 2.34
	<i>Pós</i>	-0.22 ± 2.78
	Δ	0.06 ± 1.44
$[tHb]$ ($\bar{x}\mu M$)	<i>Pré</i>	3.99 ± 5.22
	<i>Pós</i>	4.67 ± 7.07
	Δ	0.67 ± 2.85
$[dHb]$ ($\bar{x}\mu M$)	<i>Pré</i>	4.57 ± 3.90
	<i>Pós</i>	5.13 ± 4.01
	Δ	0.55 ± 2.06

Os valores são apresentados como média ± DP. $\bar{x}\mu M$: unidade de medida (veja o texto para detalhes).

A Figura 3 mostra as respostas individuais, relativas ao momento *Pré*, para cada variável após o *sham*. O nível de significância estatística (valor de p) foi obtido pelo teste t pareado. Além disso, o número de participantes (n) em que determinada variável aumentou ou diminuiu é apresentado na Figura 3. Portanto, conforme mostrado na Tabela 2 e Figura 3, o efeito *sham* não influenciou nenhuma variável.

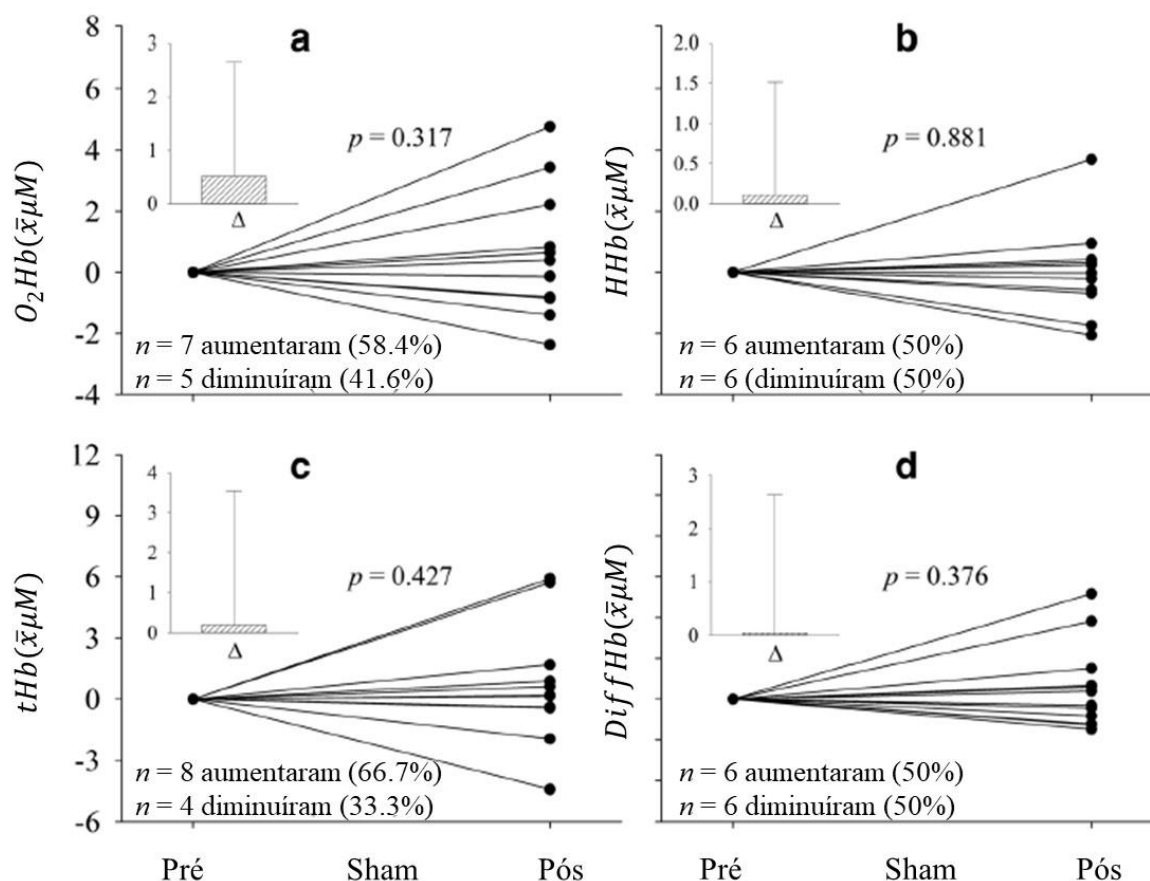


Figura 3. Concentrações da oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$), deoxi-miohemoglobina ($[HHb]$), miohemoglobina total ($[tHb]$) e diferença de miohemoglobina ($[dHb]$) antes (*Pré*) e após (*Pós*) a intervenção *sham*. Os níveis de significância estatística (valores de p) foram obtidos pelo teste t pareado. Também é apresentado o número de participantes (n) em que determinada variável aumentou ou diminuiu. $\bar{x}\mu M$: unidade de medida (veja o texto para detalhes).

Para testar as influências do efeito de resíduo entre as intervenções sob a influência da TFBM, o momento *Pré* para cada variável foi testado entre as intervenções I_1, I_2, I_3 e I_4 . Além disso, para testar se a magnitude das mudanças entre I_1, I_2, I_3 e I_4 também estavam sob a influência do efeito de resíduo entre intervenções, os valores Δ de cada variável foram testados entre as intervenções por uma ANOVA *one way* de medidas repetidas.

Conforme mostrado na Tabela 3, não foram encontradas diferenças estatísticas para nenhuma variável tanto no momento *Pré* quanto nos valores de Δ entre as intervenções I_1, I_2, I_3 e I_4 . Portanto, as hipóteses secundárias nulas (efeito *sham* e efeito de resíduo entre intervenções) foram aceitas.

Tabela 3. Concentrações da oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$), deoxi-miohemoglobina ($[HHb]$), miohemoglobina total ($[tHb]$) e diferença de miohemoglobina ($[dHb]$) antes (*Pré*) de quatro terapias com diodo emissor de luz consecutiva (intervenções de 1 a 4). Delta (Δ) foi calculado como a diferença entre os valores antes e depois da terapia.

Variável	Momentos	Intervenções				Valor de <i>p</i> entre 1 a 4
		1	2	3	4	
$[O_2Hb]$ ($\bar{x}\mu M$)	<i>Pré</i>	4.78 ± 5.03	6.75 ± 5.38	7.03 ± 6.05	6.61 ± 8.35	0.514
	Δ	0.98 ± 0.95	-0.21 ± 1.29	0.48 ± 0.92	0.46 ± 1.28	0.687
$[HHb]$ ($\bar{x}\mu M$)	<i>Pré</i>	-0.55 ± 2.78	-0.78 ± 2.92	-0.66 ± 2.77	-1.92 ± 3.80	0.138
	Δ	-0.24 ± 0.99	0.28 ± 0.97	0.00 ± 0.90	0.37 ± 1.02	0.126
$[tHb]$ ($\bar{x}\mu M$)	<i>Pré</i>	3.61 ± 7.07	5.37 ± 7.64	6.14 ± 8.39	3.96 ± 11.69	0.783
	Δ	0.84 ± 1.53	0.31 ± 1.75	0.49 ± 1.43	1.00 ± 1.29	0.968
$[dHb]$ ($\bar{x}\mu M$)	<i>Pré</i>	5.21 ± 4.01	8.46 ± 4.08	7.20 ± 4.26	8.67 ± 5.62	0.076
	Δ	0.73 ± 1.18	-0.98 ± 1.47	0.18 ± 1.14	-0.08 ± 1.92	0.118

Os valores são apresentados como média ± DP. O nível de significância estatística (valor de *p*) foi obtido por uma ANOVA *one way* de medidas repetidas entre as condições 1, 2, 3 e 4. $\bar{x}\mu M$ unidade de medida (ver texto para detalhes).

Hipótese principal: Efeito da fotobiomodulação

Pela inspeção visual dos sinais da NIRS durante os experimentos, a primeira descoberta principal deste estudo foi que o LED interferiu nos sinais, mostrando que pelo menos parte da luz emitida durante a TFBM também foi absorvida pelos cromóforos alvo da NIRS (ou seja, O_2Hb e HHb). Conforme mostrado na Figura 4, quando o dispositivo LED era ligado, a fibra óptica do receptor da NIRS foi influenciada pelos fótons emitidos. Vale ressaltar que o LED emitiu fótons em 850 nm e ambas as fontes de luz da NIRS emitiram fótons em 844 e 762 nm.

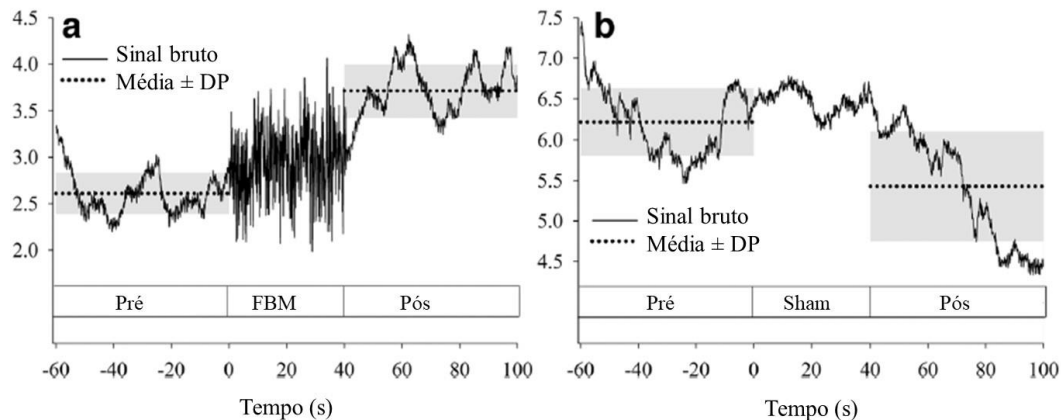


Figura 4. Ilustração da resposta aguda da concentração de oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$) do músculo flexor ulnar do carpo antes (*Pré*) e após (*Pós*) 40 s de terapia de fotobiomodulação promovida por um diodo emissor de luz (LED). Os dados são mostrados em 10 Hz e como média durante os momentos *Pré* e *Pós*. O tempo foi deslocado para o início da fotobiomodulação.

Como ambas as hipóteses nulas secundárias foram confirmadas, a ANOVA *two way* de medidas repetidas considerando os fatores intervenções (I_1 , I_2 , I_3 e I_4) e momentos (*Pré* ou *Pós*) não mostrou diferenças estatísticas em $[HHb]$ e $[dHb]$. Porém, o efeito principal do momento (*Pré* vs. *Pós*) foi encontrado em $[O_2Hb]$ e $[tHb]$. A concentração de O_2Hb e tHb aumentou estatisticamente ($p < 0.05$) de $5,68 \pm 6,08$ e $4,99 \pm 8,56 \bar{x}\mu M$ no momento *Pré* para $6,07 \pm 6,34$ e $5,68 \pm 9,20 \bar{x}\mu M$ no momento *Pós*, respectivamente. Portanto, sob a influência da TFBM, a $[O_2Hb]$ e a $[tHb]$ aumentaram $0,39$ e $0,68 \mu M$ em média, respectivamente. Considerando que cada micromolar (μM) contém 1×10^{-6} mol de uma determinada molécula por litro, e que um mol contém 6×10^{23} moléculas, houve um aumento de 2.34×10^{17} e 4.08×10^{17} moléculas de O_2Hb e tHb , respectivamente, após a TFBM por um dispositivo LED com área de $0,2 \text{cm}^2$.

A Figura 5 mostra as respostas individuais, relativas ao momento *Pré* para cada variável após a TFBM. O nível de significância estatística (valor de p) mostrado na Figura 5 foi obtido por meio do teste de ANOVA, com *post hoc* de *Student Newman Keuls*. O número de participantes (n) em que uma determinada variável aumentou ou diminuiu também é apresentado na Figura 5.

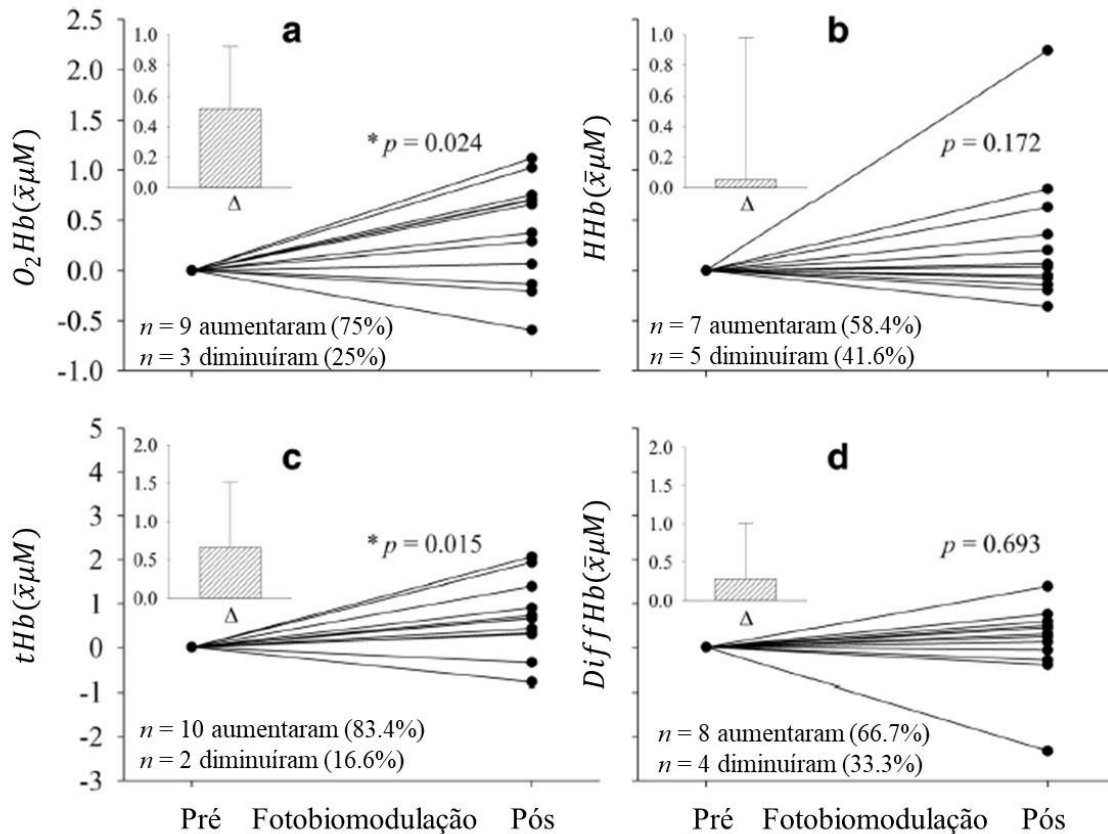


Figura 5. Ilustração da concentração de oxi-miohemoglobina ($[O_2Hb]$) em a), deoxi-miohemoglobina ($[HHb]$) em b), miohemoglobina total ($[tHb]$) em c) e diferença de miohemoglobina ($[dHb]$) em d) antes *Pré* e *Pós* a terapia de fotobiomodulação. Os níveis de significância estatística (valores de p) foram obtidos por meio do Teste de *Student-Newman-Keuls* para análise post hoc. Também é apresentado o número de participantes (n) em que determinada variável aumentou ou diminuiu. $\bar{x}\mu M$: unidade de medida (veja o texto para detalhes).

4.4 DISCUSSÃO

A principal hipótese deste estudo que a TFBM influencia o equilíbrio de oxigênio no músculo foi confirmada. A concentração de oxi e miohemoglobina total aumentaram após 40 segundos de terapia com diodo emissor de luz (LED), o que mostrou que a TFBM altera a entrega de oxigênio muscular. Além disso, o efeito *sham* e o efeito de resíduo entre intervenções não alteraram os sinais da NIRS.

Pela primeira vez, identificamos que 2 J de dose de energia fornecida por LED (850 nm, 250 mW / cm²) aumenta a $[O_2Hb]$. No nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que avaliou os efeitos agudos de 2 J da TFBM por LED *in vivo* usando a tecnologia NIRS. Esses resultados mostram o grande potencial da

NIRS, como tecnologia não invasiva, para estudos futuros com objetivo de elucidar mecanismos fisiológicos implicados ao efeito agudo da TFBM *in vivo*.

Considerando que a profundidade de penetração da luz da NIRS foi de 17,5 mm (ou seja, a metade da distância entre os cabos transmissores (T_1 e T_2) e o receptor da NIRS), a gordura subcutânea esperada deve ser menor que 17,5 mm. Nossos participantes eram homens jovens ativos saudáveis, com uma massa corporal de $25,45 \pm 3,28$, portanto, é improvável que a camada de gordura fosse maior que 17,5 mm.(28)

Estudos anteriores (29,30), que também utilizaram a NIRS no antebraço, relataram espessura média de $6,0 \pm 2,2$ mm e $4,6 \pm 1,2$, com IMC de $22,3 \pm 1,2$ e $24,0 \pm 2,1$, respectivamente. Esses valores de espessura, como esperado, são cerca de 30% da penetração máxima da luz em nosso estudo. Além disso, um dos motivos para direcionar o antebraço foi considerando que essa região possui uma das menores adiposidades, portanto, é mais adequada para o nosso teste de hipótese.

Usando diferentes métodos e parâmetros da TFBM, um estudo anterior (7) descobriu que a TFBM induziu aumentos significativos nas concentrações da *Cox* e O_2Hb . Esses autores utilizaram um laser de onda contínua de 1064 nm com densidade de potência de $0,25 \text{ W / cm}^2$ em uma área de $13,6 \text{ cm}^2$, com um tempo de 55 segundos por ciclo, resultando em uma energia total de 187 J / ciclo.(7) Por outro lado, nosso estudo usou apenas 2 J de energia de LED e um comprimento de onda específico (850 nm) para modular a *Cox*. É importante mencionar que os lasers e LEDs têm uma banda espectral relativamente estreita; entretanto, o LED é menos caro quando comparado ao laser e tem sido usado como uma alternativa à terapia a laser para tratar de forma eficiente as condições fisiopatológicas.(31)

O fato dos sinais da NIRS mudarem quando o dispositivo LED era ligado, indica que, apesar de o LED ter comprimento de onda de 850 nm, a O_2Hb também absorveu parte da energia emitida pelo dispositivo LED. Portanto, a TFBM pode estar agindo também na própria miohemoglobina, além dos mecanismos relacionados ao manuseio do oxigênio intracelular, uma vez que a miohemoglobina não possui mitocôndrias. Hayworth et al. (32) observaram em animais que a TFBM aumentou a atividade da *Cox*, possivelmente contribuindo para um metabolismo aeróbio eficiente para a produção de ATP. Como nossos

participantes estavam em repouso, onde a demanda de ATP é razoavelmente constante, uma produção otimizada de ATP oxidativo pode levar a uma menor extração de oxigênio do sangue. No entanto, conforme discutido brevemente na seção introdução, a resposta do sistema aeróbio é definida pelo produto da oferta e consumo de oxigênio de acordo com o princípio de Fick. (17) Nossos achados mostraram que a TFBM não alterou agudamente o consumo de oxigênio do músculo, uma vez que a $[HHb]$, que é um indicador da extração de oxigênio do músculo da microcirculação (33), permaneceu inalterada. Por outro lado, a $[O_2Hb]$ aumentou após a TFBM que, em associação com uma $[HHb]$ constante e uma maior $[tHb]$, indicou que um volume maior de sangue oxigenado atingiu o tecido alvo.(34)

O aumento da $[O_2Hb]$ e da $[tHb]$ no tecido músculo esquelético pode ser considerado para explicar os efeitos ergogênicos previamente relatados da TFBM quando aplicada antes do exercício físico (pré-condicionamento muscular). (35) Vários estudos relataram que a TFBM, geralmente aplicada 5 minutos antes do exercício, pode aumentar a contração voluntária máxima, o tempo de exercício e o torque. (1,35,36) Portanto, um aumento da $[O_2Hb]$ e da $[tHb]$ pode indicar alterações metabólicas locais, como a melhora da perfusão através da microcirculação (11–13), favorecendo o metabolismo celular aeróbio (2), e contribuindo para um melhor desempenho no exercício. (1,35,36)

Limitações do estudo

Em relação ao desenho do estudo, no qual a intervenção *sham* não foi distribuída aleatoriamente entre as intervenções da TFBM, e a mesma não foi aplicada no antebraço do lado oposto, outros fatores relacionados ao efeito de transporte de O_2 e ao dispositivo NIRS devem ser considerados. Em primeiro lugar, como a hipótese secundária do efeito de resíduo entre intervenções não foi recusada antes da coleta de dados, decidimos sempre aplicar o *sham* como a primeira intervenção. O suporte com aparelho de TFBM e os cabos da NIRS foram colocados no antebraço do participante e envolto em um tecido escuro. Assim, o participante nunca soube quando a TFBM estava sendo aplicada ou não, minimizando qualquer possível antecipação fisiológica. Além disso, conforme testado estatisticamente pela comparação dos momentos *Pré* entre as intervenções (I_1 , I_2 , I_3 e I_4), e considerando que os participantes não sabiam o

tempo do protocolo experimental, as variáveis da NIRS não mudaram ao longo do experimento, a menos que estivessem sob a influência da TFBM.

Em segundo lugar, os efeitos do *sham* não foram testados no antebraço oposto (ou em qualquer outro local), uma vez que o dispositivo da NIRS usado neste estudo tem uma resolução espacial limitada e mede apenas as mudanças relativas na oxi e deoxi-miohemoglobina. Portanto, os resultados são específicos para cada local e não permitem uma comparação justa entre diferentes tecidos-alvo. Além disso, acreditamos que é melhor comparar as influências da TFBM dentro da mesma localização do tecido para evitar a influência do fator de confusão, permitindo o uso de testes estatísticos pareados. Desta forma, decidimos testar as hipóteses na mesma porção do tecido (com e sem a influência da TFBM).

Terceiro, estudos futuros também podem incluir testes bioquímicos para explicar melhor o mecanismo subjacente aos nossos resultados.

4.5 CONCLUSÃO

O uso de 2 J da TFBM com LED aumentou a concentração da oximiohemoglobina e miohemoglobina total, indicando um efeito da TFBM no equilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio. Especificamente, o efeito da TFBM parece estar mais relacionado a oferta de oxigênio ao tecido local de forma aguda. Em relação às futuras implicações clínicas deste estudo, a TFBM pode ser usada para aumentar a disponibilidade de oxigênio em uma população com doenças com limitações de fornecimento de oxigênio, como no diabetes mellitus.

Informação adicional

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferraresi C, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? *J Biophotonics*. 2016 Dec;9(11–12):1273–99.

2. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang Y-Y, de Sousa MVP, Bagnato VS, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol.* 2015;91(2):411–6.
3. Ferraresi C, de Sousa MVP, Huang Y-Y, Bagnato VS, Parizotto NA, Hamblin MR. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci.* 2015 May;30(4):1259–67.
4. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989 May;56(5):691–704.
5. Francisco C de O, Beltrame T, Ferraresi C, Parizotto NA, Bagnato VS, Borghi Silva A, et al. Evaluation of acute effect of light-emitting diode (LED) phototherapy on muscle deoxygenation and pulmonary oxygen uptake kinetics in patients with diabetes mellitus: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015 Dec;16:572.
6. Wang X, Tian F, Reddy DD, Nalawade SS, Barrett DW, Gonzalez-Lima F, et al. Up-regulation of cerebral cytochrome-c-oxidase and hemodynamics by transcranial infrared laser stimulation: A broadband near-infrared spectroscopy study. *J Cereb blood flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Dec;37(12):3789–802.
7. Wang X, Tian F, Soni SS, Gonzalez-Lima F, Liu H. Interplay between up-regulation of cytochrome-c-oxidase and hemoglobin oxygenation induced by near-infrared laser. *Sci Rep [Internet].* 2016;6(1):30540. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep30540>
8. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top quantum Electron a Publ IEEE Lasers Electro-optics Soc.* 2016;22(3).
9. Murias JM, Spencer MD, Paterson DH. The critical role of O₂ provision in the dynamic adjustment of oxidative phosphorylation. *Exerc Sport Sci Rev.* 2014 Jan;42(1):4–11.
10. Beltrame T, Ferraresi C, Parizotto NA, Bagnato VS, Hughson RL. Light-emitting diode therapy (photobiomodulation) effects on oxygen uptake and cardiac output dynamics during moderate exercise transitions: a randomized, crossover, double-blind, and placebo-controlled study. *Lasers Med Sci.* 2018 Jul;33(5):1065–71.
11. Kubota J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):146–53.
12. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvasc Res.* 2002 Sep;64(2):240–6.
13. Samoilova KA, Zhevago NA, Petrishchev NN, Zimin AA. Role of nitric oxide in the visible light-induced rapid increase of human skin microcirculation at the local and systemic levels: II. healthy volunteers. *Photomed Laser Surg.*

2008 Oct;26(5):443–9.

14. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med* [Internet]. 2012 Nov 1;1(4):267–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23626925>
15. Barbosa R, Marcolino A, Souza V, Bertolino G, Fonseca M, Guirro R. Effect of Low-Level Laser Therapy and Strength Training Protocol on Hand Grip by Dynamometry. *J Lasers Med Sci*. 2017;8(3):112–7.
16. Jones S, Chiesa ST, Chaturvedi N, Hughes AD. Recent developments in near-infrared spectroscopy (NIRS) for the assessment of local skeletal muscle microvascular function and capacity to utilise oxygen. *Artery Res* [Internet]. 2016 Dec;16:25–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27942271>
17. Hughson RL. Oxygen uptake kinetics: historical perspective and future directions. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab*. 2009 Oct;34(5):840–50.
18. Ferreira LF, Townsend DK, Lutjemeier BJ, Barstow TJ. Muscle capillary blood flow kinetics estimated from pulmonary O₂ uptake and near-infrared spectroscopy. *J Appl Physiol*. 2005 May;98(5):1820–8.
19. Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med*. 2000;27(5):427–37.
20. Ihsan FRM. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*. 2005 Jun;23(3):289–94.
21. Boushel R, Langberg H, Olesen J, Gonzales-Alonzo J, Bülow J, Kjaer M. Monitoring tissue oxygen availability with near infrared spectroscopy (NIRS) in health and disease. *Scand J Med Sci Sports*. 2001 Aug;11(4):213–22.
22. Grassi B, Quaresima V. Near-infrared spectroscopy and skeletal muscle oxidative function in vivo in health and disease: a review from an exercise physiology perspective. *J Biomed Opt*. 2016 Sep;21(9):91313.
23. Puente-Maestu L, Tena T, Trascasa C, Pérez-Parra J, Godoy R, García MJ, et al. Training improves muscle oxidative capacity and oxygenation recovery kinetics in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Appl Physiol*. 2003 Feb;88(6):580–7.
24. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ*. 2010 Mar;340:c332.
25. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Vol. 894, World Health Organization technical report series. Switzerland; 2000.
26. Van Beekvelt MC, Colier WN, Wevers RA, Van Engelen BG. Performance

- of near-infrared spectroscopy in measuring local O₂ consumption and blood flow in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2001 Feb;90(2):511–9.
27. Ghasemi A, Zahediasl S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *Int J Endocrinol Metab* [Internet]. 2012/04/20. 2012;10(2):486–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23843808>
 28. Imeson JD, Haines AP, Meade TW. Skinfold thickness, body mass index and ischaemic heart disease. *J Epidemiol Community Health* [Internet]. 1989 Sep;43(3):223–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2607299>
 29. Celie B, Boone J, Van Coster R, Bourgois J. Reliability of near infrared spectroscopy (NIRS) for measuring forearm oxygenation during incremental handgrip exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2012 Jun;112(6):2369–74.
 30. Crenshaw AG, Elcadi GH, Hellstrom F, Mathiassen SE. Reliability of near-infrared spectroscopy for measuring forearm and shoulder oxygenation in healthy males and females. *Eur J Appl Physiol*. 2012 Jul;112(7):2703–15.
 31. Miranda EF, Leal-Junior ECP, Marchetti PH, Dal Corso S. Acute effects of light emitting diodes therapy (LEDT) in muscle function during isometric exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease: preliminary results of a randomized controlled trial. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):359–65.
 32. Hayworth CR, Rojas JC, Padilla E, Holmes GM, Sheridan EC, Gonzalez-Lima F. In vivo low-level light therapy increases cytochrome oxidase in skeletal muscle. *Photochem Photobiol*. 2010;86(3):673–80.
 33. DeLorey DS, Kowalchuk JM, Paterson DH. Relationship between pulmonary O₂ uptake kinetics and muscle deoxygenation during moderate-intensity exercise. *J Appl Physiol*. 2003 Jul;95(1):113–20.
 34. Beltrame T, Villar R, Hughson RL. Sex differences in the oxygen delivery, extraction, and uptake during moderate-walking exercise transition. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab*. 2017 Sep;42(9):994–1000.
 35. Ferraresi C, Beltrame T, Fabrizzi F, do Nascimento ESP, Karsten M, Francisco C de O, et al. Muscular pre-conditioning using light-emitting diode therapy (LEDT) for high-intensity exercise: a randomized double-blind placebo-controlled trial with a single elite runner. *Physiother Theory Pract*. 2015 Jul;31(5):354–61.
 36. Leal-Junior ECP, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho P de TC, Dal Corso S, Bjordal JM. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2015 Feb;30(2):925–39.

5. ESTUDO 2

(versão em português com detalhamentos e inclusão de ilustrações)

“Efeito dose-resposta da terapia de fotobiomodulação nas respostas hemodinâmicas e metabólicas agudas em adultos com Diabetes *mellitus* tipo 2: um estudo randomizado, cruzado, duplo-cego e *sham* controlado”²

Stephanie Nogueira Linares, Thomas Beltrame, Gabriela Aguiar Mesquita Galdino, Maria Cecilia Moraes Frade; Juliana Cristina Milan-Mattos; Mariana de Oliveira Gois; Audrey Borghi-Silva; Priscila Faleiro de Biase; Fúlvia de Barros Manchado Gobatto; Vanderlei Salvador Bagnato Nivaldo Antônio Parizotto; Cleber Ferraresi; Aparecida Maria Catai

² Artigo submetido ao periódico *Frontiers in Physiology*

5.1 INTRODUÇÃO

O diabetes é uma doença metabólica crônica associada a complicações e a um risco aumentado de morte prematura. (1) Atualmente, o número estimado de adultos, com idade entre 20 e 79 anos, com diabetes mellitus representa 463 milhões. Com projeções de crescimento ainda maior para as próximas décadas, estudos relatam que em 2045 haverá 700 milhões de pessoas com diabetes. (1–3)

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é rotineiramente descrito como um distúrbio metabólico caracterizado pela resistência à insulina e/ou falha da função das células beta pancreáticas. (2–5) A persistência do estado hiperglicêmico é o principal fator desencadeante de danos e disfunções micro e macrovasculares, que ocorrem devido a distúrbios metabólicos e estruturais, que incluem os efeitos patológicos de acúmulo dos produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês, *Advanced Glycated End-Products*), ativação anormal de cascatas de sinalização (proteína quinase C [PKC]), produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs), e estimulação anormal dos sistemas de regulação hemodinâmicas. (4,6)

As intervenções na dieta e no estilo de vida continuam sendo os pilares no manejo do DM2, entretanto, nos últimos anos, estudos investigaram a possibilidade de novos métodos de terapia e identificaram uma nova possibilidade, a terapia por fotobiomodulação (TFBM). (7,8)

O conceito e a importância clínica da TFBM têm alcançado notoriedade na comunidade científica nos últimos anos, por ser uma modalidade terapêutica não invasiva que consiste na aplicação de fonte de luz de baixa intensidade com o objetivo de estimular atividades biológicas no tecido-alvo. (9–13)

Um ensaio clínico randomizado prévio de nosso grupo de pesquisa (8) observou os efeitos agudos da TFBM por meio de diodos emissores de luz (LEDs), com comprimento de onda de $850 \pm 20\text{nm}$, na dinâmica da oxigenação muscular durante a transição do repouso para o exercício, e nos níveis de glicose e lactato no sangue em indivíduos com DM2. Eles identificaram que a combinação de 150 Joules (J) de energia total por músculo associado ao exercício físico, foram capazes de promover uma redução significativa nos níveis glicêmicos pós-exercício. (8)

Como também mostrado anteriormente, os efeitos da TFBM têm sido amplamente estudados em cultura de células (14,15), modelos animais (13,16–18), combinado ao exercício físico (8,19) com objetivo de avaliar o desempenho muscular (20) e a recuperação pós-exercício. (20,21) No entanto, os efeitos de diferentes energias da TFBM, por meio de LEDs, nos sistemas cardiovascular e/ou hemodinâmico e metabólico em indivíduos com DM2 ainda não estão claros, assim como as energias ideais ainda não foram definidas. Hipotetiza-se que a aplicação da TFBM seja capaz de diminuir a resistência vascular periférica e os níveis glicêmicos em indivíduos com DM2.

Sendo assim, o objetivo principal deste estudo é analisar os efeitos agudos de diferentes energias da TFBM por meio de LEDs nos sistemas hemodinâmico e metabólico em indivíduos com DM2 e estabelecer uma curva dose-resposta.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo e declaração de ética

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, cruzado, duplo-cego e controlado por *sham* envolvendo homens com DM2 e seguiu as diretrizes do CONSORT 2010. (22) Os dados foram coletados no período de junho de 2018 a fevereiro de 2020 Este estudo está de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) para pesquisas médicas envolvendo seres humanos e recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CAAE: 80989017.6.0000.5504) da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. Além disso, segue as normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos (Resolução 466 de 2012, Conselho Nacional de Saúde) e está registrado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC, ID RBR-6vgmtb em 10/08/2018), seguindo a *Plataforma Internacional de Registro de Ensaio Clínicos da Organização Mundial da Saúde* (ICTRP-OMS). Todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Procedimentos de randomização e cegamento

Por se tratar de um estudo cruzado e controlado por sham, as 6 energias (sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J) foram randomizadas por meio de um site (<https://www.random.org/>). Os pesquisadores envolvidos na condução e/ou análise dos dados permaneceram cegos até o final do estudo e foram orientados a não informar os indivíduos qual a energia da TFBM seria irradiada em cada sessão.

Uma vez que a TFBM não induz nenhum estímulo sensível para as energias aplicadas (ou seja, quente, frio ou irritação da pele), os sujeitos também foram cegados quanto a ordem da irradiação da TFBM (energias efetivas) ou *sham*. O procedimento de randomização e cegamento foi realizado de acordo com a declaração CONSORT 2010. (22)

População de estudo

Indivíduos com idades entre 40-64 anos, com diagnóstico de DM2, de acordo com as recomendações da *American Diabetes Association*, (glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, 2 horas no TTOG ≥ 200 mg/dL, ou HbA1c $\geq 6,5\%$). (23) Os critérios de não inclusão do estudo foram: história prévia de doença arterial coronariana (DAC), neuropatia autonômica cardiovascular (NAC), (verificada por pelo menos três testes autonômicos específicos de acordo com Boulton *et al.* (24)), índice de massa corporal (IMC) maior ou igual 35 kg/m^2 (correspondente a obesidade grau II e III), alteração eletrocardiográfica (ECG), como anormalidade do segmento ST (elevação ou depressão), isquemia, bloqueio do ramo cardíaco direito ou esquerdo ou arritmias de repouso ou induzidas pelo teste de exercício cardiorrespiratório (TECP); fumantes, etilista, usuários de drogas ilícitas ou medicamentos que pudessem afetar as respostas das variáveis estudadas, sujeitos com classificação funcional aeróbia boa ou excelente segundo a *American Heart Association* (25) e indivíduos com disfunções respiratórias, neurológicas ou osteomioarticulares que impossibilitassem a execução do protocolo do estudo.

Para a caracterização da amostra, foi realizada uma avaliação clínica inicial (Figura 1a) composta por anamnese e exames laboratoriais, hemoglobina

glicada (HbA1c), nível de insulina e glicemia de jejum (de 10 a 12 horas de jejum), realizados por meio do analisador *ADVIA 1800 Chemistry System (Siemens, Tarrytown, NY, EUA)*, e, uma avaliação clínica composta por um TECP, na presença de um cardiologista. O grau de resistência à insulina foi determinado no início do estudo pelo modelo de avaliação *Homeostatic model assessment (HOMA-IR)*. (26,27)

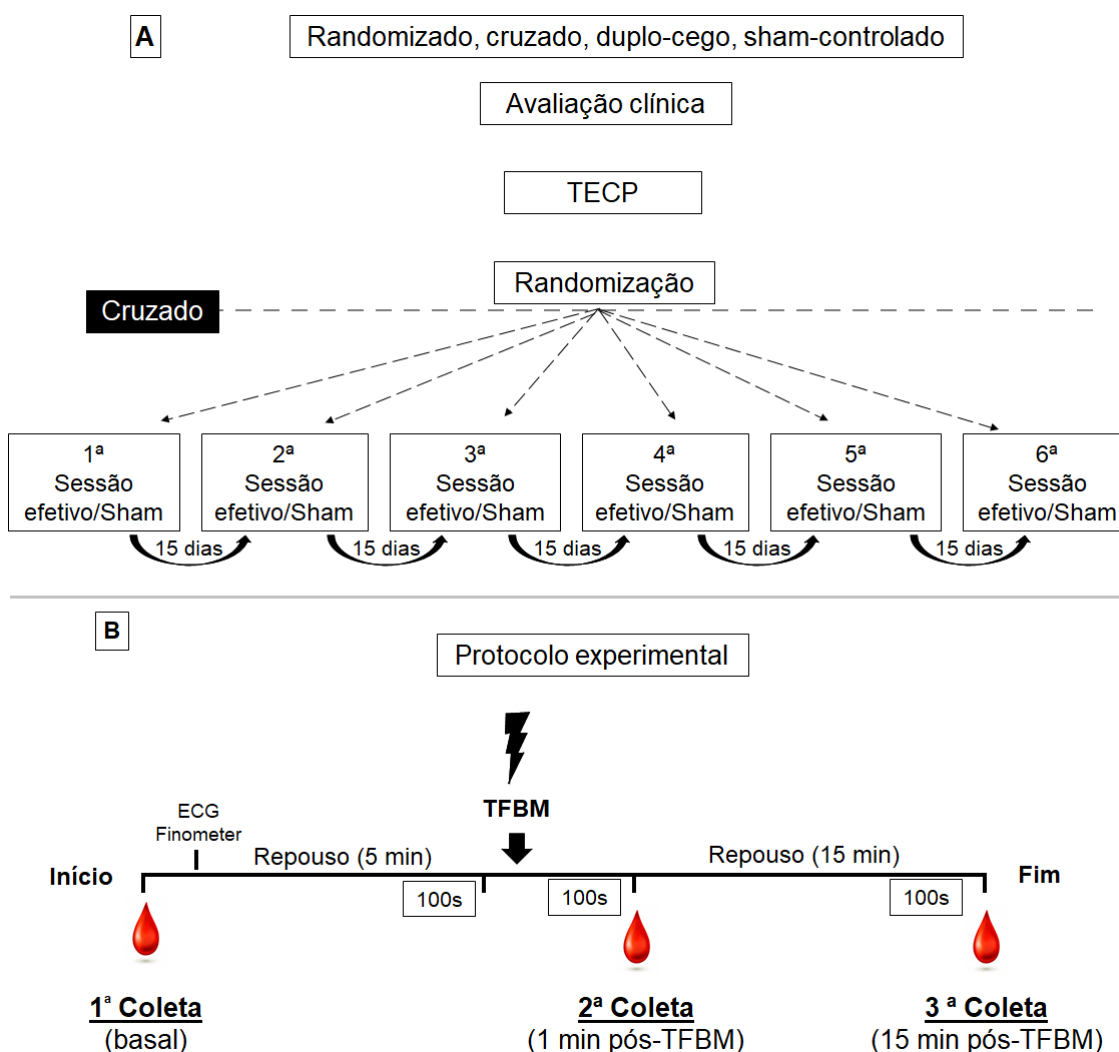


Figura 1. Desenho experimental. **a)** os sujeitos foram previamente submetidos a uma avaliação clínica composta por exame laboratorial e teste de exercício cardiorrespiratório (TECP). Após as avaliações, as energias da terapia de fotobiomodulação (TFBM) ou *sham* correspondente a cada sessão foram randomizadas (com um período de *washout* de 15 dias). **b)** no dia do protocolo experimental, os sujeitos foram monitorizados e posicionados em repouso, posição sentada, e foi realizada a primeira coleta de amostra de sangue, para posterior análise dos níveis de glicemia e lactato sanguíneo. Após 5 minutos em repouso, a TFBM (efetivo ou *sham*) foi aplicada, e uma amostra de sangue foi coletada 1 minuto após a irradiação da TFBM. Por fim, após 15 minutos da irradiação da TFBM, foi realizada a última coleta de sangue.

Protocolo experimental

Todos os sujeitos realizaram 9 visitas ao laboratório, sendo 6 destinadas ao protocolo experimental, com um período de *wash-out* de 15 dias entre as intervenções. O período de *wash-out* é necessário entre os tratamentos, para permitir que o efeito residual (*carry-over*) do tratamento anterior não interfira no tratamento seguinte.

Em cada sessão, eles foram submetidos a diferentes protocolos de irradiação de energia da TFBM, podendo ser efetivo ou *sham*, em ordem aleatória, e as variáveis fisiológicas foram medidas nos seguintes momentos: basal, 1 min pós-TFBM e 15 min pós-TFBM (Figura 1b).

No dia anterior a cada protocolo, os sujeitos eram orientados a evitarem exercícios vigorosos, ingestão de álcool e cafeína. Na visita denominada protocolo experimental, antes de cada sessão, a glicemia dos voluntários era medida por meio de um glicosímetro (marca *Accu-Chek® Active*). Os procedimentos experimentais sempre foram realizados no período da manhã, com os pacientes em vigência dos fármacos prescritos. Durante as sessões, o sinal ECG era captado por meio de um amplificador (*BioAmp Power Lab – AD Instruments, Castle Hill, NSW, Australia*) e a pressão arterial no dedo medida por um aparelho de fotopletomografia Finometer PRO (*Finapres Medical System, Amsterdam, Netherlands*). Os sinais foram integrados a uma taxa amostral de 1000 Hz usando um dispositivo comercial de aquisição de dados (*Power Lab 8/35, AD Instruments, Castle Hill, NSW, Australia*). Após a coleta, os dados foram exportados, segundo a segundo, e analisados pelo software *LabChart 7 (Power Lab®, ADInstruments, Sydney, Austrália)*. As seguintes variáveis foram avaliadas nos momentos previamente descritos: débito cardíaco (\dot{Q}), volume sistólico final (VSF), frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM).

A partir desses dados, foram obtidas as seguintes variáveis secundárias: $IC = \dot{Q} / ASC$, onde IC = índice cardíaco, ASC = área de superfície corporal (em m²) calculada como altura² x peso / 3600; índice de volume sistólico (IVS), como o VSF dividido pelo ASC (ml/m²); $RVP = PAM / \dot{Q}$, onde RVP = resistência vascular periférica (em mmHg x min/L); $IRVP = RVP / ASC$ onde IRVP = índice de resistência vascular periférica.

Para a análise das variáveis hemodinâmicas, selecionamos 100 segundos de dados antes do final de cada momento (basal, 1 min pós-TFBM e 15 min pós-TFBM). Posteriormente, os 40 segundos finais dos dados foram removidos porque esse período correspondeu ao período da coleta da amostra de sangue do lóbulo da orelha, sendo então considerado o valor médio dos 60 segundos de dados para cada momento.

Terapia de fotobiomodulação por diodos emissores de luz (LEDs)

Para a TFBM utilizamos uma matriz composta por 50 LEDs do tipo arseneto de gálio e alumínio (Ga-Al-As), com comprimento de onda de 850 ± 20 nm e 75 mW de potência cada diodo, aplicada em contato direto sobre a pele primeiramente nos músculos reto e oblíquo do abdome, seguido por quadríceps femoral (direito depois esquerdo), tríceps sural e por fim, isquiotibiais, bilateralmente (Figura 2). O dispositivo é um protótipo não comercial desenvolvido por duas universidades brasileiras: Universidade Federal de São Carlos e Universidade de São Paulo. (8,28)

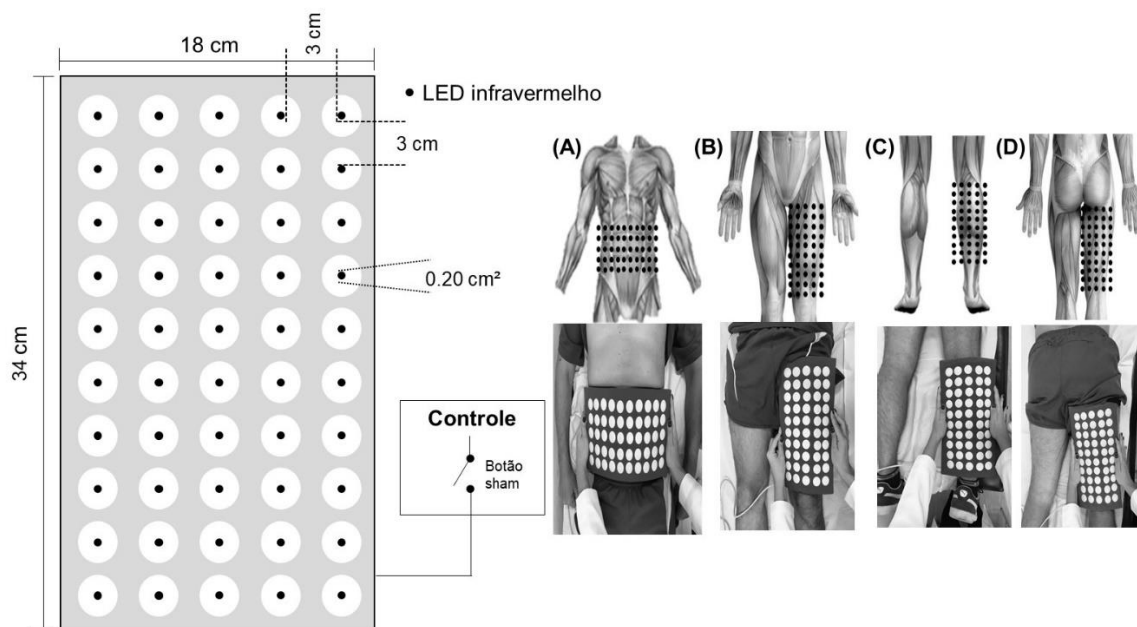


Figura 2. Disposição de 50 diodos emissores de luz (LEDs), com comprimento de onda de 850 ± 20 nm, potência de 75 mW e área de feixe de $0,20 \text{ cm}^2$ em cada LED e 3 cm equidistante. Para a condição *sham*, um interruptor oculto interrompia as emissões de luz. A TFBM foi aplicada em contato direto, seguindo a sequência apresentada, sobre a pele nas áreas musculares do reto e oblíquo do abdome (a), quadríceps femoral (b), tríceps sural (c) e isquiotibiais (d), bilateralmente.

Os parâmetros utilizados sobre cada área descrita na figura 2 estão na Tabela 1. A condição *sham* seguiu o mesmo procedimento, porém, com o equipamento desligado por um botão oculto. O dispositivo foi constantemente calibrado por um medidor de energia óptica (*PM100D Thorlabs®*, Newton, New Jersey, EUA) conectado a um sensor de luz S130C (área de 0,7 cm²) para garantir que a potência correta de luz e energia fossem entregues. (28)

Tabela 1. Parâmetros de terapia de fotobiomodulação e locais de aplicação

Parâmetros de irradiação						
Tipo de TFBM	Diodo semiconductor de Ga-Al-As					
Quantidade de pontos / diodos	50					
Comprimento de onda	850 ± 20 nm					
Frequência	Saída contínua					
Potência	75 mW por diodo					
Área de saída de cada diodo	0,2 cm ²					
Energia por diodo	0 J, 1,5 J, 3 J, 6 J, 9 J, 12 J					
Densidade de potência por diodo	0 ou 375 mW/cm ²					
Área total	612 cm ²					
Modo de aplicação	Contato direto					
	<i>Sham</i>	75 J	150 J	300 J	450 J	600 J
Tempo de tratamento por músculo (s)	80	20	40	80	120	160
Energia total irradiada por músculo	0 J	75 J	150 J	300 J	450 J	600 J
Tempo total (s)	560	140	280	560	840	1.120
Energia total entregue (4 regiões)	0 J	525 J	1.050 J	2.100 J	3.150 J	4.200 J

TFBM: terapia por fotobiomodulação; Ga-Al-As: arseneto de gálio-alumínio; LED: diodo emissor de luz; nm: nanômetros; mW: milliwatts; cm²: centímetro ao quadrado; J: joules; mW/cm²: milliwatts por centímetro ao quadrado; s: segundos.

Durante a coleta de dados, os sujeitos eram orientados a não falar desnecessariamente e a respirar espontaneamente.

Níveis de glicose e lactato sanguíneo

Para cada indivíduo e momento (basal, 1 min pós-TFBM e 15 min pós-TFBM), um volume de 25 µl de sangue era coletado do lóbulo da orelha direita por meio de um capilar de vidro heparinizado. Imediatamente após a coleta do sangue, o conteúdo era armazenado em um microtúbulo contendo 50 µl de solução anticoagulante (composta por fluoreto de sódio a 1%). Posteriormente, essas amostras foram processadas em um analisador de glicose e lactato (*YSI 2300 STAT Plus - Yellow Springs Instruments - Yellow Springs, Ohio, EUA*). (8)

O analisador foi calibrado seguindo os procedimentos recomendados do fabricante.

As amostras de sangue foram coletadas assim que o voluntário chegava ao laboratório, correspondente ao momento basal, e nos últimos 40 segundos dos momentos 1 min pós-TFBM e 15 min pós-TFBM.

Análise estatística

A análise de intenção de tratar foi realizada para as variáveis hemodinâmicas usando o método de imputação de valores para todos os dados ausentes.

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão (DP). Foram realizadas comparação intragrupos (nos momentos: basal, 1 min pós-TFBM e 15 min pós-TFBM) e entre grupos (energias: TFBM-efetiva e TFBM-*sham*) (Joules) por análise de variância (ANOVA) *two-way* de medidas repetidas para dados paramétricos e o teste de *Kruskal-Wallis* e *Friedman* seguido de *post hoc* de *Holm Sidak* para os dados não paramétricos. As comparações entre grupos, TFBM-efetiva e TFBM-*sham*, dos deltas (Δ 1' pós TFBM e Δ 15' pós TFBM) foram realizadas utilizando ANOVA *one-way* de medidas repetidas para os dados paramétricos e ANOVA *on ranks* seguido pelo teste de *Tukey* para os dados não paramétricos.

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os dados foram analisados com o *SigmaPlot* versão 14.0 (*Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA*).

5.3 RESULTADOS

Foram elegíveis 104 indivíduos, dos quais 90 foram excluídos após triagem inicial (detalhados na Figura 3). As características dos indivíduos incluídos estão resumidas na Tabela 2. Todos os indivíduos faziam uso de medicamentos para o controle glicêmico. Durante os protocolos experimentais, não houve mudanças dos fármacos e do estilo de vida.

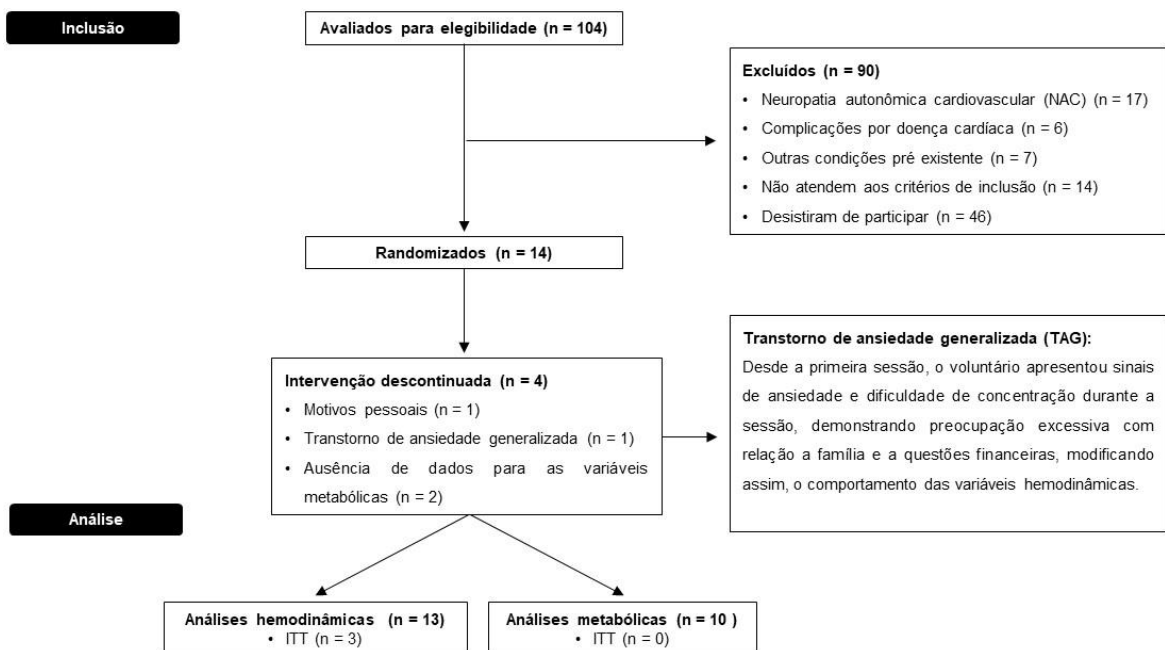


Figura 3. Fluxograma. Um total de 104 indivíduos atenderam os critérios de inclusão e foram avaliados no período de junho de 2018 a fevereiro de 2020. Noventa indivíduos foram excluídos devido aos critérios de exclusão, sendo eles: dezessete com NAC; seis com complicações de doença cardíaca; sete com outras condições pré-existentes; quatorze não preencheram os critérios de inclusão e quarenta e seis por abandono devido a longos períodos de avaliação, porém, antes da randomização. No total, 14 sujeitos foram randomizados, sendo um excluído por motivos pessoais, um excluído por TAG e dois por dados faltantes. No total, 10 indivíduos completaram o estudo. Além disso, incluímos na intenção de tratar (ITT) três indivíduos somente nas análises hemodinâmicas.

Tabela 2. Características da amostra estudada (n = 13)

Idade (anos)	52,7 ± 7,1
Características antropométricas	
Peso corporal (Kg)	91,0 ± 10,8
IMC (Kg/m ²)	29,3 ± 2,9
ASC (m ²)	2,10 ± 0,14
Características clínicas	
Tempos de diabetes (anos)	12,7 ± 7,3
FC de repouso (bpm)	75 ± 10
PAS de repouso (mmHg)	126,7 ± 6,8
PAD de repouso (mmHg)	72,2 ± 3,3
Exames laboratoriais	
HbA _{1c} (%)	7,8 ± 1,8
Insulina de jejum (μU/ml)	15,6 ± 14,1
Glicemia de jejum (mg/dL)	180,1 ± 42,3
Sensibilidade à insulina (%; HOMA)	4,0 ± 2,1
Fármacos (n, (%))	
Insulina	3/13
Antidiabético oral	13/13
Biguanidas	13
Sulfonilureias	3
Glitazonas	3
Inibidores SGLT2	1
Anti-hipertensivo	8/13
Diuréticos	4
Bloqueadores de receptor AT ₁	8
Hipolipemiante	4/13
Fibrato	1
Estatina	4
Reposição de T4	1/13
Inibidores de enzima	1/13

Valores expressos em média ± desvio padrão (DP); **Kg**: quilograma; %: porcentagem; **IMC**: índice de massa corporal; **Kg/m²**: quilograma por metro quadrado; **mm**: milímetros; **ASC**: área de superfície corporal; **m²**: metro quadrado; **FC**: frequência cardíaca; **bpm**: batimento por minuto; **PAS**: pressão arterial sistólica; **mmHg**: milímetros de mercúrio; **PAD**: pressão arterial diastólica; **HbA_{1c}**: hemoglobina glicada; **μU/ml**: microunidades por mililitro; **mg/dL**: miligrama decilitro; **HOMA**: avaliação da homeostase da resistência à insulina; **SGLT2**: cotransportador sódio-glicose 2; **Receptor AT₁**: receptor de angiotensina 1; **T4**: tetraiodotironina.

A Tabela 3 mostra a análise das respostas metabólicas. Em relação aos níveis glicêmicos, foi observada redução significativa para a energia de 75 (-10,3%) e 450 J (-13,7%) após 15 minutos de irradiação da TFBM ($p=0,013$ e $p=0,002$, respectivamente), como visto na Figura 4. Não foram observadas diferenças entre as energias estudadas, mesmo após a realização da comparação entre as variações (Δ) dos momentos 1 min pós-TFBM e 15 min pós-TFBM, visto na Figura 6A.

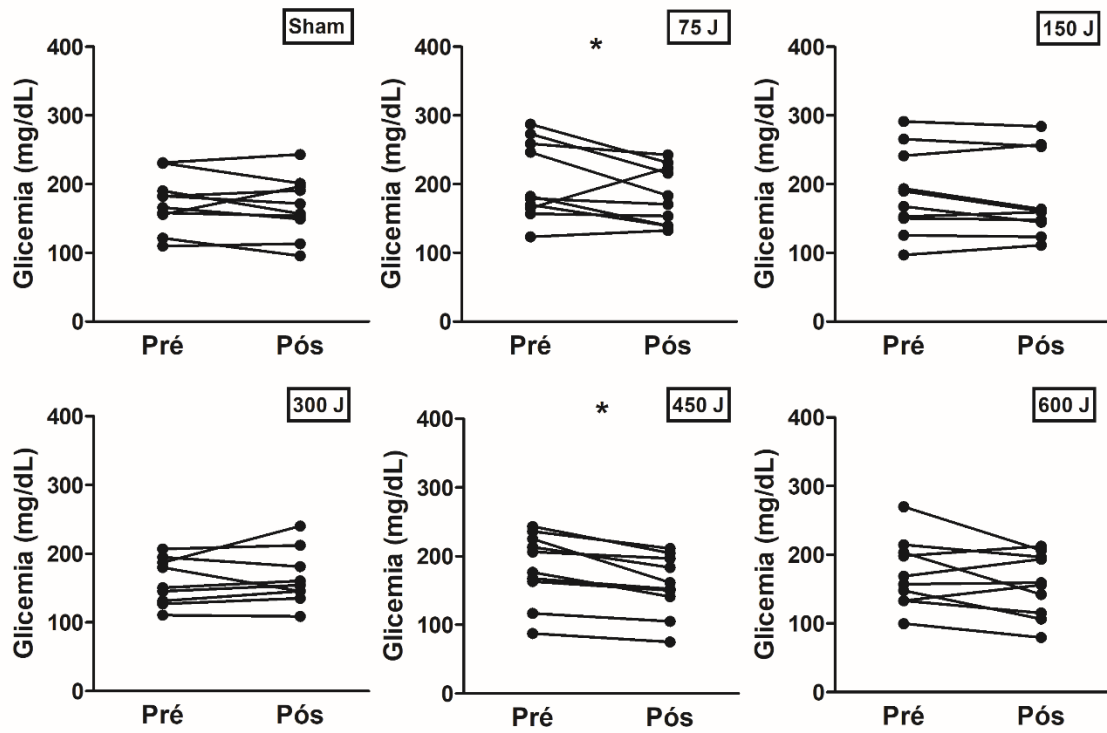


Figura 4. Resposta individual dos níveis de glicemia sanguínea (mg/dL) pré e pós protocolo experimental de cada energia, sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J.
 *: $p < 0,05$ quando comparado com o valor basal.

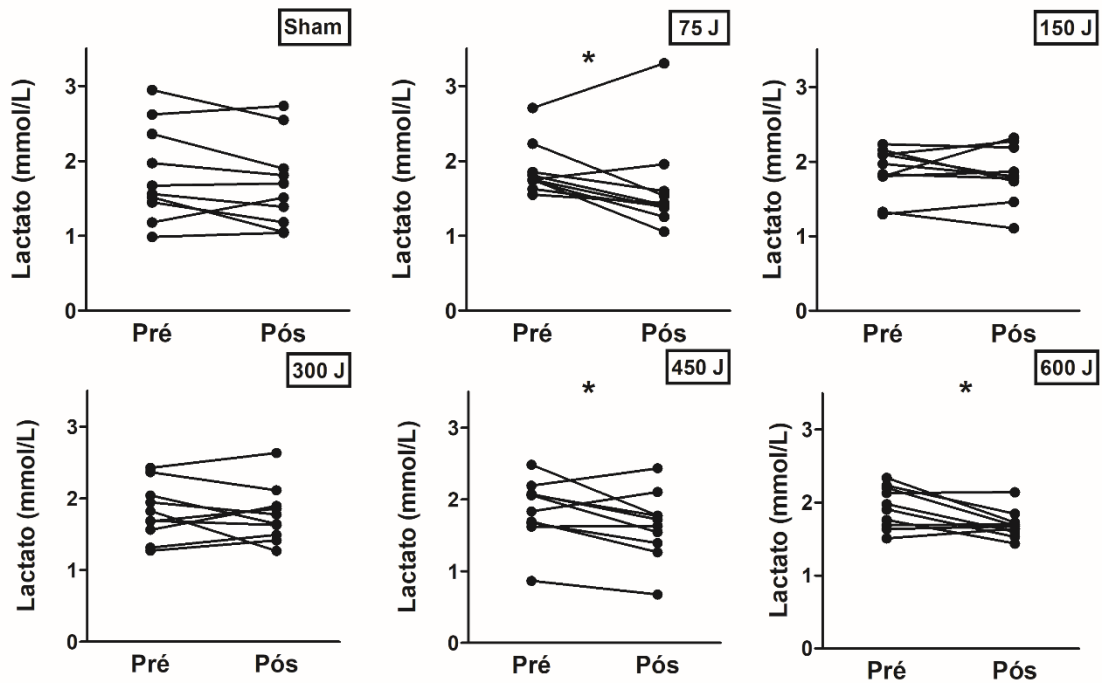


Figura 5. Resposta individual dos níveis de lactato sanguínea (mg/dL) pré e pós protocolo experimental de cada energia, sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J.
 *: $p < 0,05$ quando comparado com o valor basal.

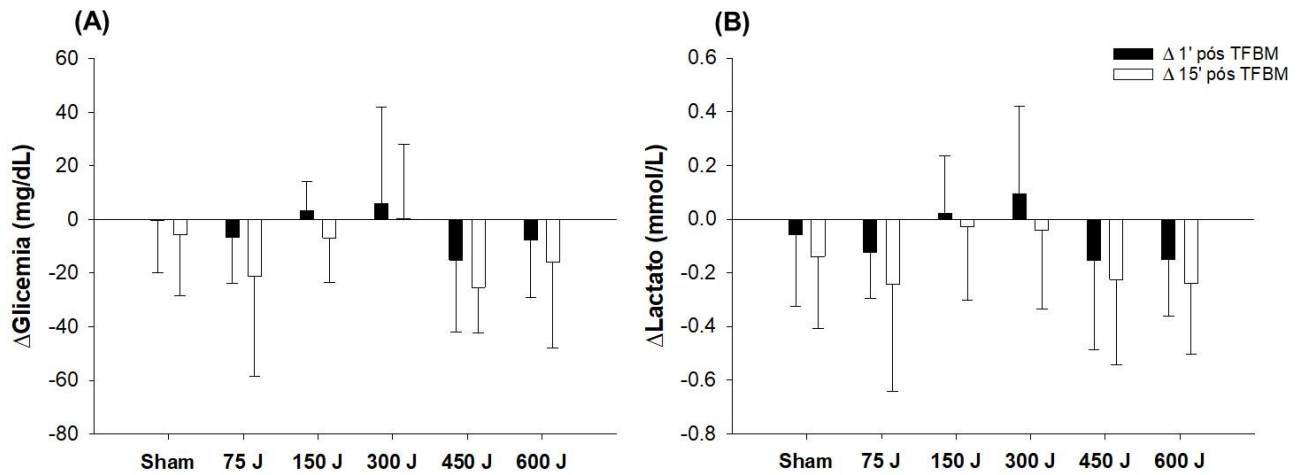


Figura 6. Variações (Δ) dos níveis de glicemia (A) e lactato (B) nos momentos 1 minuto após a TFBM e 15 minutos após a TFBM nas energias sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J.

Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis metabólicas nos momentos basais, 1 minuto e 15 minutos pós-PBMT para as energias sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J

	Sham	75 J	150 J	300 J	450 J	600 J
Glicemia (mg/dL) (n = 10)						
Basal	172,7 \pm 39,9	204,2 \pm 56,8	187,3 \pm 62,2	176,5 \pm 63,6	183,4 \pm 51,4	172,5 \pm 49,5
1 min pós-TFBM	172,4 \pm 39,0	197,7 \pm 50,8	190,6 \pm 61,7	182,6 \pm 42,0	168,4 \pm 49,7	165 \pm 49,5
15 min pós-TFBM	167,1 \pm 43,5	183,0 \pm 42,1 *	180,6 \pm 61,2	176,9 \pm 54,1	158,1 \pm 43,8 *	156,8 \pm 45,9
Lactato (mmol/L) (n = 10)						
Basal	1,82 \pm 0,63	1,87 \pm 0,34	1,86 \pm 0,32	1,81 \pm 0,39	1,85 \pm 0,44	1,93 \pm 0,28
1 min pós-TFBM	1,76 \pm 0,64	1,75 \pm 0,47	1,88 \pm 0,35	1,90 \pm 0,53	1,70 \pm 0,44	1,78 \pm 0,28
15 min pós-TFBM	1,68 \pm 0,58	1,63 \pm 0,63 *	1,83 \pm 0,37	1,77 \pm 0,39	1,63 \pm 0,47 *	1,69 \pm 0,19*

TFBM: terapia por fotobiomodulação; **J:** Joules; **mg/dL:** miligrama decilitro; **mmol/L:** milimol de litro.

*: $p < 0,05$ quando comparado com o momento basal.

#: $p < 0,05$ quando comparado com 1 min pós-TFBM.

Tabela 4. Média e desvio padrão das variáveis hemodinâmicas nos momentos basais, 1 minuto e 15 minutos pós-PBMT para as energias sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J

	<i>Sham</i>	75 J	150 J	300 J	450 J	600 J
\dot{Q} (L) (n = 13)						
Basal	8,75 ± 2,4	8,13 ± 1,6	8,68 ± 2,0	8,56 ± 1,5	8,13 ± 1,3	8,83 ± 1,5
1 min pós-TFBM	9,23 ± 2,6	8,97 ± 1,9 *	8,84 ± 2,3	9,72 ± 1,7 *	8,57 ± 1,5	8,69 ± 1,6
15 min pós-TFBM	8,73 ± 2,5	8,78 ± 1,7 *	8,85 ± 2,2	9,01 ± 1,5 #	8,17 ± 1,7	8,54 ± 1,6
IC (ml/m²) (n = 13)						
Basal	4,20 ± 1,1	3,91 ± 0,8	4,16 ± 0,8	4,11 ± 0,6	3,91 ± 0,6	4,25 ± 0,7
1 min pós-TFBM	4,43 ± 1,2	4,32 ± 0,9 *	4,26 ± 1,0	4,66 ± 0,7 *	4,12 ± 0,7	4,18 ± 0,7
15 min pós-TFBM	4,18 ± 1,1	4,24 ± 0,9 *	4,24 ± 0,9	4,33 ± 0,6 #	3,93 ± 0,8	4,11 ± 0,7
VSF (ml) (n = 13)						
Basal	114,5 ± 23,6	102,3 ± 20,7	115,7 ± 24,7	110,3 ± 21,3	110,9 ± 17,2	110,3 ± 20,2
1 min pós-TFBM	119,4 ± 25,7	111,1 ± 21,6 *	115,7 ± 27,0	120,9 ± 17,0 *	113,6 ± 22,6	107,5 ± 16,5
15 min pós-TFBM	116,0 ± 30,4	110,9 ± 23,0 *	118,1 ± 27,3	116,8 ± 23,8	110,8 ± 25,0	108,4 ± 20,4
IVS (ml/m²) (n = 13)						
Basal	55,1 ± 11,1	49,2 ± 9,7	55,4 ± 10,8	53,0 ± 9,9	53,3 ± 7,8	53,0 ± 9,2
1 min pós-TFBM	57,3 ± 11,9	53,5 ± 10,8 *	55,5 ± 11,9	58,1 ± 7,5 *	54,7 ± 10,7	51,6 ± 7,0
15 min pós-TFBM	55,7 ± 14,6	53,5 ± 12,2 *	56,6 ± 12,2	56,2 ± 11,2	53,3 ± 11,7	52,1 ± 9,2
FC (bpm) (n = 13)						
Basal	77 ± 12	78 ± 11	77 ± 11	79 ± 11 **	74 ± 8	79 ± 10 **
1 min pós-TFBM	78 ± 11	79 ± 11	77 ± 10	81 ± 10 * **	76 ± 7 *	80 ± 8
15 min pós-TFBM	77 ± 11	77 ± 11	76 ± 10	79 ± 11 #	75 ± 9	78 ± 10 #
PAS (mmHg) (n = 13)						
Basal	138,3 ± 11,1	132,6 ± 11,6	132,4 ± 9,8	130,2 ± 8,6	133,5 ± 9,7	137,1 ± 12,1
1 min pós-TFBM	138,0 ± 16,3	135,8 ± 15,8	130,2 ± 7,9	133,7 ± 12,4	135,0 ± 12,0	139,7 ± 17,3
15 min pós-TFBM	137,3 ± 11,8	133,6 ± 13,6	133,2 ± 9,9	132,0 ± 8,1	134,7 ± 16,1	138,3 ± 16,0
PAD (mmHg) (n = 13)						
Basal	74,9 ± 7,7	73,1 ± 7,0	71,8 ± 4,9	71,6 ± 4,0	72,5 ± 5,0	74,1 ± 8,5
1 min pós-TFBM	72,1 ± 10,6	71,4 ± 7,7	70,1 ± 5,6	70,1 ± 5,6	72,4 ± 6,3	75,3 ± 11,7
15 min pós-TFBM	74,7 ± 7,8	71,6 ± 6,4	72,0 ± 4,3	71,0 ± 3,3	72,6 ± 6,2	74,1 ± 9,4
PAM (mmHg) (n = 13)						
Basal	96,0 ± 8,1	92,9 ± 7,8	92,0 ± 6,1	91,1 ± 4,2	92,8 ± 5,9	95,1 ± 8,8
1 min pós-TFBM	94,1 ± 12,1	92,9 ± 9,9	90,8 ± 6,0	91,3 ± 7,3	93,3 ± 7,4	96,7 ± 13,1
15 min pós-TFBM	95,7 ± 8,2	92,3 ± 7,7	92,4 ± 5,6	91,4 ± 3,3	93,3 ± 8,8	95,5 ± 10,5
RVP (mmHg/L/min) (n = 13)						
Basal	11,9 ± 3,0	12,3 ± 3,7	11,5 ± 2,4	11,1 ± 2,0	11,8 ± 2,1	11,1 ± 1,5
1 min pós-TFBM	11,0 ± 2,5	11,0 ± 2,6 *	11,2 ± 2,9	9,8 ± 1,4 *	11,4 ± 2,2	11,5 ± 1,7
15 min pós-TFBM	12,2 ± 4,4 #	11,2 ± 2,9 *	11,2 ± 2,4	10,5 ± 1,6	11,9 ± 1,9	11,7 ± 2,3
IRVP (mmHg.min/L/m²) (n = 13)						
Basal	5,7 ± 1,6	5,9 ± 1,9	5,6 ± 1,40	5,4 ± 1,2	5,7 ± 1,2	5,3 ± 0,8
1 min pós-TFBM	5,3 ± 1,2	5,3 ± 1,3 *	5,4 ± 1,6	4,7 ± 0,9 *	5,5 ± 1,2	5,6 ± 0,9
15 min pós-TFBM	5,9 ± 2,4 #	5,4 ± 1,5 *	5,4 ± 1,4	5,1 ± 1,0	5,8 ± 1,1	5,6 ± 1,3

TFBM: terapia por fotobiomodulação; **J:** Joules; **\dot{Q} :** débito cardíaco; **L:** litro; **IC:** índice cardíaco; **ml/m²:** mililitro por metro quadrado; **VSF:** volume sistólico final; **ml:** mililitro; **IVS:** índice de volume sistólico; **FC:** frequência cardíaca; **bpm:** batimentos por minuto; **PAS:** pressão arterial sistólica; **mmHg:** milímetro de mercúrio; **PAD:** pressão arterial diastólica; **PAM:** pressão arterial média; **RVP:** resistência vascular periférica; **mmHg/L/min:** milímetros de mercúrio por litro por minuto; **IRVP:** índice de resistência vascular periférica; **mmHg.min/L/m²:** milímetros de mercúrio por minuto por litro por metro quadrado.

*: $p < 0,05$ quando comparado com o momento basal.

#: $p < 0,05$ quando comparado com 1 min pós-TFBM.

**: $p < 0,05$ quando comparado a energia de 450 J no momento basal.

***: $p < 0,05$ quando comparado com a energia de 450 J no momento 1 min pós-TFBM.

Para a análise dos níveis de lactato sanguíneo, uma redução significativa foi observada para a energia de 75 (-12,9%), 450 (-11,8%) e 600 J (-12,4%) após

15 minutos de irradiação TFBM ($p = 0,013$, $p = 0,025$ e $p = 0,014$, respectivamente). A Figura 5 ilustra essas respostas de forma individual e a Figura 6B as variações (Δ), os quais, não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Na Tabela 4 e Figura 7A é possível observar as mudanças no \dot{Q} em comparação com as diferentes energias e momentos. Para 75 J, foi observado aumento significativo após 1 minuto ($p = 0,002$) da irradiação da TFBM, com manutenção significativa após 15 minutos ($p = 0,015$). Para 300 J, observamos um aumento significativo após 1 minuto ($p < 0,001$). Porém, houve redução do \dot{Q} após 15 minutos ($p = 0,007$). O mesmo comportamento é visto no IC. Além disso, na comparação do Δ das energias efetivas e *sham* no momento 1 min pós-TFBM observamos diferença entre as energias 75 e 600 J ($p = 0,010$) e 300 e 600 J ($p = 0,005$). As mesmas diferenças foram observadas no Δ do momento 15 min pós-TFBM ($p = 0,007$, e $p = 0,029$, respectivamente) no $\Delta\dot{Q}$ e no ΔIC (Figura 9A e 9B).

Em relação ao VSF e o IVS nas energias de 75 e 300 J foram observados aumento significativo após 1 minuto, com $p = 0,009$ e $p = 0,002$, respectivamente, e para o VSF no momento 15 min pós-TFBM, com $p = 0,013$. Na comparação dos Δ , Figura 9E e 9F, observamos diferenças entre as energias de 75 e 600 J e de 300 e 600 J tanto para o Δ 1 min pós-TFBM ($p = 0,021$, e $p = 0,002$), quanto para o Δ 15 min pós-TFBM ($p = 0,021$, e $p = 0,029$).

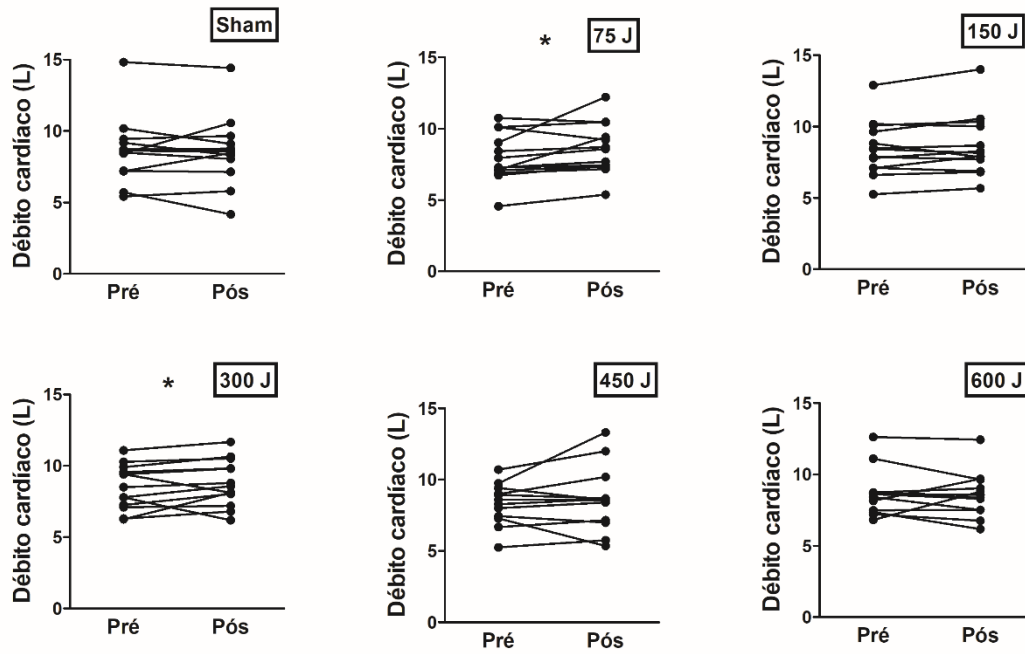


Figura 7. Resposta individual do débito cardíaco (L) pré e pós protocolo experimental de cada energia, sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J.
*: $p < 0,05$ quando comparado com o valor basal.

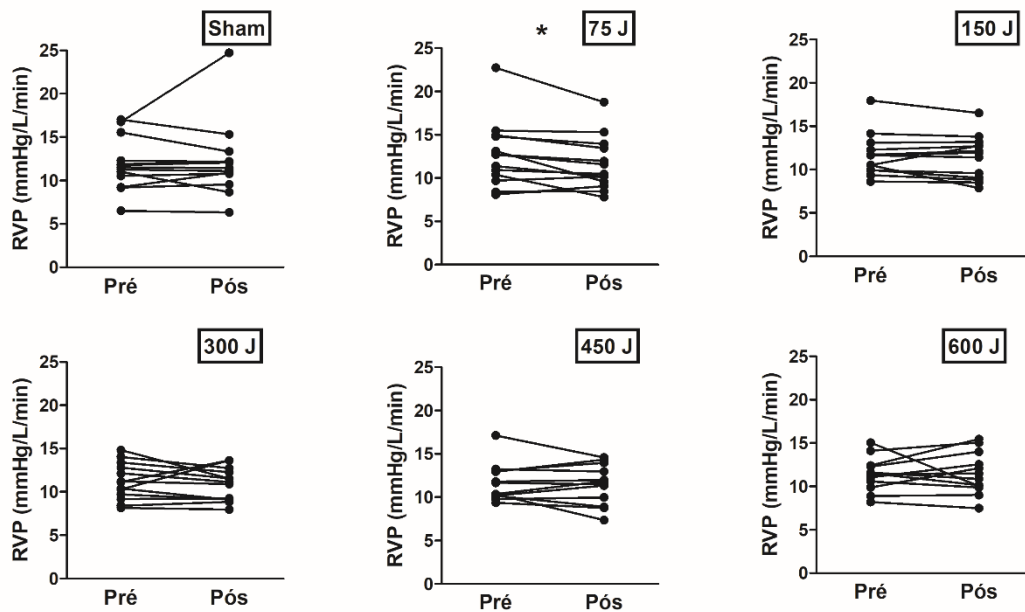


Figura 8. Resposta individual da resistência vascular periférica (mmHg/L/min) pré e pós protocolo experimental de cada energia, sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J.
*: $p < 0,05$ quando comparado com o valor basal.

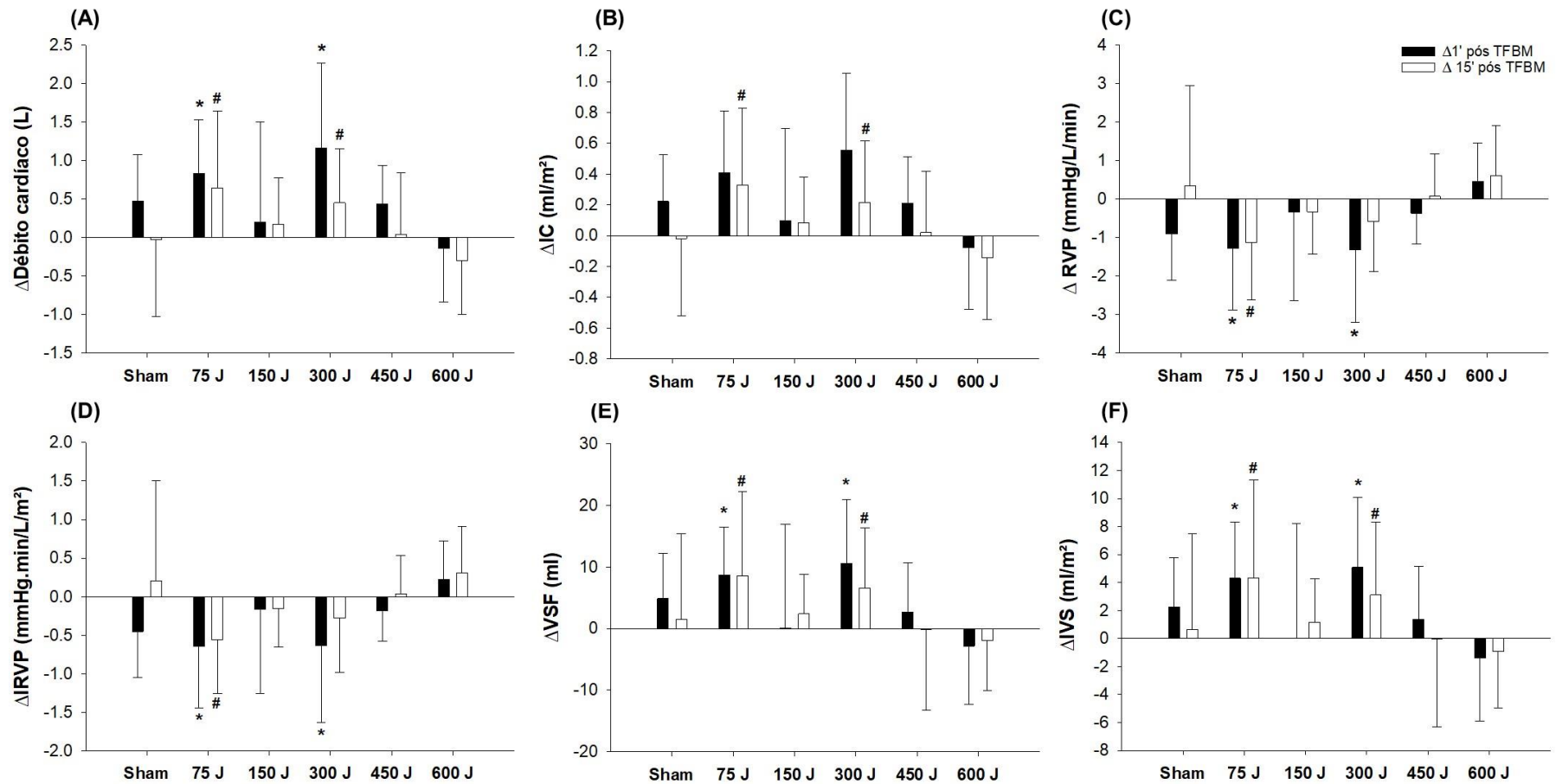


Figura 9. Variações (Δ) das variáveis hemodinâmicas. Em **(A)** débito cardíaco ($\Delta\dot{Q}$), **(B)** índice cardíaco (ΔIC), **(C)** resistência vascular periférica (RVP), **(D)** índice de resistência vascular periférica ($\Delta IRVP$), **(E)** volume sistólico final (ΔVSF) e **(F)** índice de volume sistólico (ΔIVS) no momento 1 min e 15 min pós-TFBM para energia, sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J.

*: $p < 0,05$ quando comparado com a energia de 600 J no momento 1min pós TFBM.

#: $p < 0,05$ quando comparado com a energia de 600 J no momento 15 min pós TFBM

Para a análise da RVP e do IRVP (Tabela 4 e Figura 8), observamos diminuição estatisticamente significativa na comparação entre os momentos 1 minuto com o momento basal para a energia de 75 e 300 J, com $p = 0,017$ e $p = 0,014$, respectivamente. Ainda, na energia de 75 J observamos diminuição da RVP e do IRVP quando comparado o momento basal com o momento 15' pós-TFBM, com $p = 0,030$. E na condição sham observamos um aumento da RVP e do IRVP quando comparado o momento 1 min com o momento 15 min pós-TFBM, com $p = 0,020$). Ainda, observamos diferenças estatisticamente significativa entre as energias 75 e 600 J e 300 e 600 no Δ RVP (Figura 9C) e o Δ IRVP (Figura 9D) no Δ do 1 min pós-TFBM, com $p = 0,005$ e $p = 0,003$, e no Δ do 15 min pós-TFBM para as energias 75 vs 600 J, com $p = 0,010$.

Na análise da FC (Tabela 4) foi observada diferença entre as energias de 300 e 450 J quando comparado o momento basal, com $p = 0,020$. Em relação ao momento 1 min pós-TFBM, observamos que as energias de 300 e 450 J apresentaram um aumento da FC, com $p = 0,035$ e $p = 0,013$, respectivamente, e as energias de 300 e 600 J uma redução após 15 min da irradiação da TFBM quando comparado ao momento 1 minuto ($p = 0,024$ e $p = 0,017$). Ainda, no Δ do 1° minuto pós-TFBM observamos diferença entre as energias de 150 e 300 J, com $p = 0,039$.

Por fim, observamos diferença entre as energias de 75 e 600 J no Δ da PAM no momento 15 min pós-TFBM ($p = 0,039$). Para as demais variáveis, não observamos diferenças significativas.

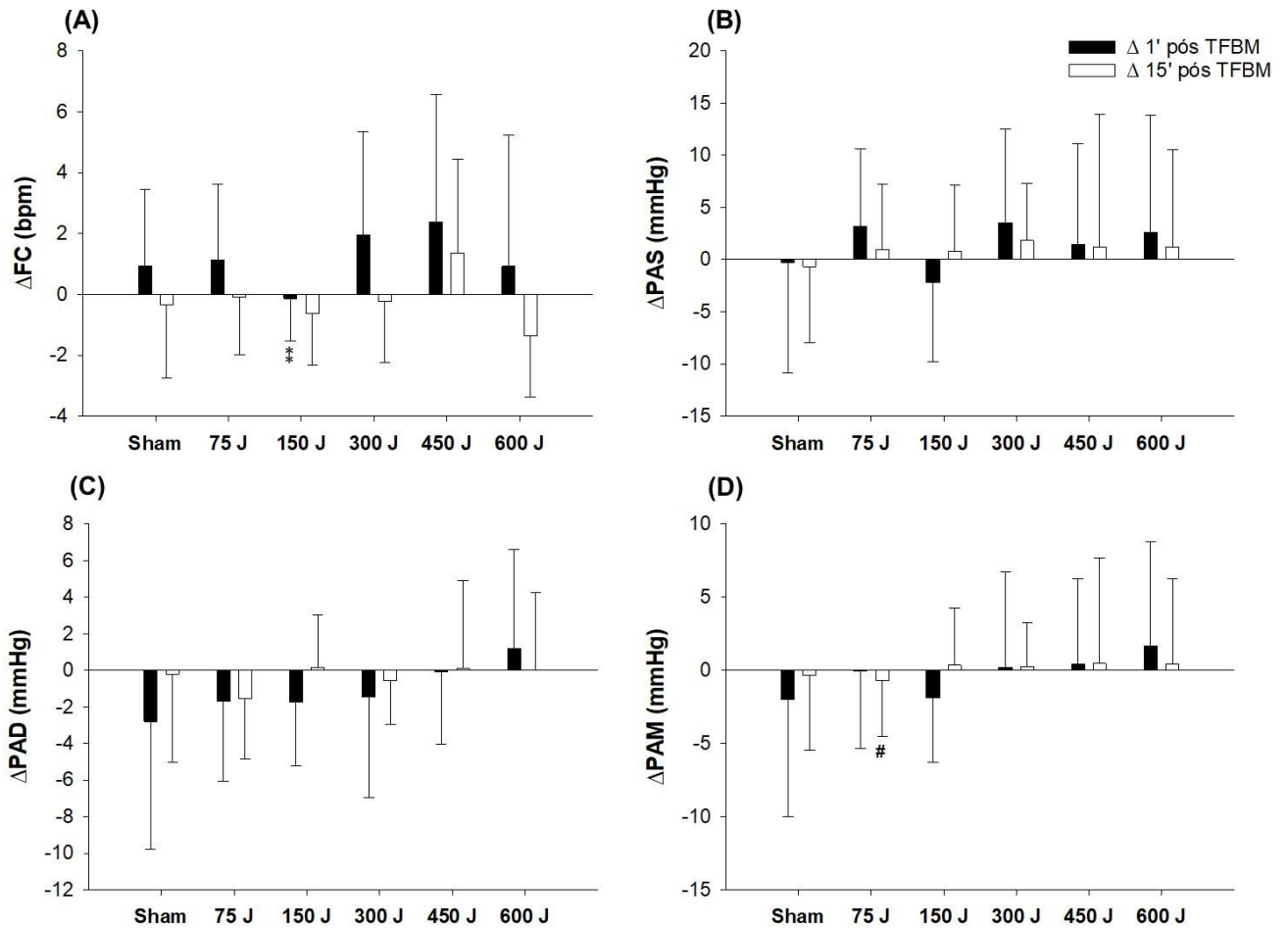


Figura 10. Variações (Δ) das variáveis hemodinâmicas, em **(A)** frequência cardíaca (Δ FC) **(B)** pressão arterial sistólica (Δ PAS), **(C)** pressão arterial diastólica (Δ PAD), **(D)** pressão arterial média (Δ PAM) nos momentos 1 min e 15 min pós-TFBM para *sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J. *: $p < 0,05$ quando comparado com a energia de 300 J no momento 1 min pós TFBM #: $p < 0,05$ quando comparado com a energia de 600 J no momento 15 min pós TFBM.

5.4 DISCUSSÃO

Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a investigar o efeito dose-resposta da terapia por fotobiomodulação (TFBM) por meio de diodos emissores de luz (LEDs) em indivíduos com DM2. Os principais achados do presente estudo foram: (a) redução da glicemia após 15 minutos de irradiação para 75 e 450 J; (b) redução dos níveis de lactato sanguíneo após 15 minutos da irradiação com energias de 75, 450 e 600 J; (c) aumento do \dot{Q} e IC após 1 minuto da irradiação para as energias de 75 e 300 J; (d) redução do \dot{Q} e IC após 15 minutos da irradiação para a energia de 300 J; (e) redução na FC após 15 minutos de irradiação para a energia de 600 J; (f) e, diferença estatística entre

75 J e 600 J e 300 e 600 J para as variáveis hemodinâmicas ($\Delta\dot{Q}$, ΔIC , ΔRVP e $\Delta IRVP$).

A escolha pelas janelas terapêuticas apresentadas no presente estudo se deve aos resultados apresentado no estudo de Francisco et. al.(8). Mediante as respostas apresentadas pelos autores, optamos por adotar 2 energias acima e 2 energias abaixo da proposta no estudo citado, o qual trabalhou com as energias 150 e 300 J.

Um resultado interessante observado foi a nítida resposta bifásica à irradiação da TFBM por LEDs nas variáveis hemodinâmicas, apresentando efeitos benéficos em baixas e intermediárias energias, e possíveis efeitos inibitórios em altas energia (600 J) e/ou tempo de exposição do tecido. Em contrapartida, para as variáveis metabólicas, observou-se que altas energias (450 e 600J) foram capazes de produzir um efeito melhor. Isso indica um efeito positivo da TFBM aplicado para a regulação cardiometabólica e sugere a viabilidade clínica para a aplicação da TFBM.

Efeitos hemodinâmicos

Considerando a pressão arterial média como o produto do débito cardíaco (\dot{Q}) multiplicado pela resistência vascular periférica (RVP), a pressão arterial pode ser regulada tanto por alterações em \dot{Q} (alterações no volume sistólico ou frequência cardíaca) ou alterações na RVP ou variações em ambas. (17) Portanto, é possível que o aumento do \dot{Q} tenha sido causado como mecanismo de resposta para a manutenção da pressão arterial, uma vez que não houve alterações significativas nesta.

Em resposta, observamos queda relevante na RVP nas energias entre 75 a 300 J, o que pode estar relacionado a um aumento do fluxo sanguíneo para os tecidos periféricos mediado pela TFBM devido ao efeito vasodilatador induzido pelo óxido nítrico (NO), que já é documentado em alguns estudos experimentais. (17,29,30) Por outro lado, observamos um efeito hemodinâmico oposto quando aplicada a energia de 600 J, uma vez que foi constatado elevação da RVP.

Nesse último caso, como possível explicação para o aumento da RVP observado após 1 minuto da aplicação da TFBM, especulamos três possíveis mecanismos: (1) a resposta vascular local aguda, com a produção e liberação de fatores vasoconstritores locais (ex.: endotelina) (9); e/ou (2) o efeito agudo do sistema nervoso simpático sobre o tônus vascular periférico e sobre a modulação das respostas da frequência cardíaca, uma vez que foi observado aumento da FC no 1º minuto, seguido pela diminuição após 15 minutos. No entanto, não há nenhuma evidência experimental prévia em humanos que demonstre tais efeitos agudos quando aplicadas altas energias. (31)

A mesma resposta em altas energias da TFBM foi observada em estudo experimental com animais, porém, com irradiação de luz laser nas variáveis de pressão arterial e FC. (17) No entanto, pouco se revelou sobre os possíveis mecanismos, tendo os autores especulado sobre uma terceira hipótese: (3) que a luz estimula a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (EROs). Por isso, é provável que, quando estimulado por baixas energias, a TFBM pode estimular vias de sinalização celulares benéficas, contudo, em energias mais altas, a produção de EROs podem prejudicar o funcionamento das mitocôndrias, o que pode induzir a apoptose por meio de uma via mitocondrial, incluindo a liberação de citocromo c oxidase (Cox). (17,32)

Ainda, um ensaio clínico prospectivo, randomizado e controlado (33) avaliou os efeitos da irradiação, na região do punho, incluindo as artérias ulnar e radial, de um cluster composto por LEDs vermelho (comprimento de onda em 633 nm, densidade de potência de 70 mW/cm² e densidade de energia entregue de 21 J/cm²) ou, infravermelho (comprimento de onda de 830 nm, densidade de potência de 55mW e densidade de energia entregue de 16,5 J/cm²) em 20 voluntários jovens saudáveis, não fumantes, por um tempo de 5 minutos. A monitorização do fluxo sanguíneo e da temperatura da pele foi realizada por meio da fotopleetismografia, fluxometria por laser doppler (FLP) e imagens térmicas antes, durante e 20 minutos após a irradiação e observaram que a TFBM infravermelha induziu a uma vasodilatação arteriolar imediata e de longa duração, que resultou em aumento do fluxo capilar e perfusão tecidual quando comparada a vermelha. (33)

Embora esses achados tenham sido dependentes do comprimento de onda específicos, eles mostram informações de extrema relevância uma vez que observamos um efeito inédito com a redução da RVP, a qual, muito provavelmente, foi ocasionada devido ao efeito vasodilatador promovido pela TFBM.

Respostas metabólicas

Embora os indivíduos tenham recebido tratamento farmacológico para hiperglicemia e apresentassem níveis normais de lactato sanguíneo durante o estudo, podemos considerar o uso da TFBM como um caminho promissor para indivíduos com DM2, pois após 15 minutos de irradiação da TFBM observamos que os níveis glicêmicos apresentaram redução em 25 mg/dL e os níveis de lactato apresentaram redução em até 0,24 mmol/L para a energia mais alta (600 Joules).

Os possíveis mecanismos de ação estão relacionados à regulação da atividade da citocromo c oxidase (Cox) pelos fotorreceptores e à síntese de glicogênio muscular. (9,16,34,35) A TFBM é conhecida por modular a função mitocondrial, aumentando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) das células musculares, (34–36) possível ressíntese de fosfocreatina e redução da acidificação ao acelerar a oxidação de lactato em piruvato através do metabolismo mitocondrial. (37) Ainda, sobre os mecanismos de ação da TFBM, um estudo em modelo animal observou um aumento na atividade da citrato sintase (CS), uma enzima chave responsável por catalisar a primeira reação do ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs), que está intimamente relacionado a Cox. (38,39) Assim, parece haver um aumento na atividade do ciclo de Krebs após a irradiação da TFBM, aumentando o uso da glicose para a síntese de ATP, o que pode contribuir para a redução dos níveis de glicemia sanguínea junto ao aumento da síntese de glicogênio muscular. (16,39)

Um ensaio clínico randomizado prévio constatou que a combinação de exercício aeróbio de intensidade moderada com irradiação de 150 J da TFBM por LEDs (comprimento de onda de 850 ± 20 nm, 75 mW cada diodo, aplicado bilateralmente nos músculos quadríceps femoral e tríceps sural por 40s em cada local) foram capazes de promover uma diminuição significativa dos níveis de

glicemia no sangue, porém, sem nenhuma alteração nos níveis de lactato, em indivíduos com DM2. (8) No presente estudo, observamos a melhor magnitude de resposta com consequente redução dos níveis de glicemia e lactato nas energias de 450 e 600 J, respectivamente. Supomos que essas diferenças estejam relacionadas ao fato de que o nosso estudo avaliou o efeito isolado da TFBM, e Francisco *et al.* (8) associaram a TFBM ao exercício físico, tendo sido a TFBM aplicada em uma menor área (músculos quadríceps e tríceps sural).

Ainda, é importante lembrar que os sujeitos de nosso estudo estavam sob tratamento medicamentoso, incluindo fármacos para o controle glicêmico. Apesar disso, visto que no desenho experimental proposto os voluntários eram controle deles mesmos para cada uma das energias, isto é, o mesmo indivíduo participou das energias efetivas e *sham*, consideramos que a influência dessa terapia farmacológica nos resultados foi minimizada. Além disso, os medicamentos em utilização e suas respectivas dosagens não foram alterados ao longo do estudo.

Outro estudo avaliou o efeito da energia e do tempo-resposta da TFBM usando um cluster com 69 LEDs (com 35 vermelho = 630 ± 10 nm e 34 infravermelho = 850 ± 20 nm) na glicemia e concentração de glicogênio muscular em ratos não diabéticos. ⁸⁷ Nesse mesmo estudo, os autores verificaram que a energia de 10 J/cm^2 , aplicada nas costas, membros posteriores e músculos glúteos máximos por 90 segundos, contribuiu para a diminuição dos níveis de glicemia sérica e maior síntese de glicogênio muscular após TFBM. (16)

Em relação aos níveis de lactato sanguíneo, observamos que a maioria dos estudos combinou a TFBM com exercício e avaliaram a melhora no desempenho e recuperação muscular em indivíduos saudáveis. (11,40) Apesar da análise detalhada dos estudos de revisão, os autores observaram que os estudos apresentaram de baixo a moderado nível de evidência científica e sugerem atenção e cautela quanto ao uso da TFBM, enfatizando a necessidade de novos estudos com qualidade metodológica e que sigam uma janela terapêutica. (11,40)

Assim, nossos achados parecem estar relacionados ao fato de a TFBM ter sido irradiada em sete locais: músculo quadríceps, tríceps sural, isquiotibiais e reto e oblíquo do abdome, bilateralmente.

5.5 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a irradiação da TFBM por meio de LEDs promoveu mudanças nas variáveis metabólicas e hemodinâmicas em homens com DM2. Os melhores efeitos foram observados principalmente nas variáveis \dot{Q} , RVP, FC, glicemia e lactato, com TFBM aplicada com comprimento de onda de 850 ± 20 nm e 75 mW de potência. Para as variáveis hemodinâmicas, observamos que a janela terapêutica ideal variou entre 75 a 300 J, enquanto que para as variáveis metabólicas foi de 450 a 600 J.

Limitações do estudo

O estudo realizado apresenta uma limitação quanto ao tamanho da amostra, que se apresenta em número reduzido, entretanto, realizados o teste estatístico para identificar o *Power* para o teste de ANOVA frente os achados da variáveis glicemia utilizando as respectivas informações: diferença mínima entre as médias = 10 mg/dL; desvio padrão mínimo = 5 mg/dL; número de grupos = 6; tamanho da amostra = 10; alfa = 0,08 e obtivemos um *Power* de 0.954.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (bolsa 2013 / 07953-3 e 2017 / 09639-5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (bolsa 311938 / 2013-2 e 425360/2018 -0), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Bolsa de Pesquisa AUXPE 1766732 / 2018–2021). Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

Informação adicional

Interesses competitivos

Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2019;157:107843. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822719312306>
2. Rawshani A, Rawshani A, Franzén S, Eliasson B, Svensson A-M, Miftaraj M, et al. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017 Apr;376(15):1407–18.
3. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Apr;138:271–81.
4. Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab* [Internet]. 2016;20(4):546–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27366724>
5. ADA. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care* [Internet]. 2021 Jan 1;44(Supplement 1):S15 LP-S33. Available from: http://care.diabetesjournals.org/content/44/Supplement_1/S15.abstract
6. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* [Internet]. 2013 May 2;34(31):2436–43. Available from: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh149>
7. Poitras VJ, Hudson RW, Tschakovsky ME. Exercise intolerance in Type 2 diabetes: is there a cardiovascular contribution? *J Appl Physiol*. 2018 May;124(5):1117–39.
8. Francisco C de O, Beltrame T, Hughson RL, Milan-Mattos JC, Ferroli-Fabricio AM, Galvão Benze B, et al. Effects of light-emitting diode therapy (LEDT) on cardiopulmonary and hemodynamic adjustments during aerobic exercise and glucose levels in patients with diabetes mellitus: A randomized, crossover, double-blind and placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med*. 2019 Feb;42:178–83.
9. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top quantum Electron a Publ IEEE Lasers Electro-optics Soc*. 2016;22(3).
10. Linares SN, Beltrame T, Ferraresi C, Galdino GAM, Catai AM. Photobiomodulation effect on local hemoglobin concentration assessed by near-infrared spectroscopy in humans. *Lasers Med Sci*. 2020 Apr;35(3):641–9.
11. Nampo FK, Cavalheri V, Dos Santos Soares F, de Paula Ramos S, Camargo EA. Low-level phototherapy to improve exercise capacity and

- muscle performance: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2016 Dec;31(9):1957–70.
12. Wang X, Tian F, Soni SS, Gonzalez-Lima F, Liu H. Interplay between up-regulation of cytochrome-c-oxidase and hemoglobin oxygenation induced by near-infrared laser. *Sci Rep [Internet].* 2016;6(1):30540. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep30540>
 13. Silva G, Ferraresi C, de Almeida RT, Motta ML, Paixão T, Ottone VO, et al. Infrared photobiomodulation (PBM) therapy improves glucose metabolism and intracellular insulin pathway in adipose tissue of high-fat fed mice. *Lasers Med Sci.* 2018 Apr;33(3):559–71.
 14. Gál P, Mokry M, Vidinsky B, Kilik R, Depta F, Harakalová M, et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Jul;24(4):539–47.
 15. Tang J, Du Y, Lee CA, Talahalli R, Eells JT, Kern TS. Low-intensity far-red light inhibits early lesions that contribute to diabetic retinopathy: in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 May;54(5):3681–90.
 16. Castro KMR, de Paiva Carvalho RL, Junior GMR, Tavares BA, Simionato LH, Bortoluci CHF, et al. Can photobiomodulation therapy (PBMT) control blood glucose levels and alter muscle glycogen synthesis? *J Photochem Photobiol B Biol [Internet].* 2020;207:111877. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134420303249>
 17. De Moraes TF, Filho JCC, Oishi JC, Almeida-Lopes L, Parizotto NA, Rodrigues GJ. Energy-dependent effect trial of photobiomodulation on blood pressure in hypertensive rats. *Lasers Med Sci [Internet].* 2020;35(5):1041–6. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02883-5>
 18. Yoshimura TM, Sabino CP, Ribeiro MS. Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice. *J Biophotonics [Internet].* 2016 Dec 1;9(11–12):1255–62. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbio.201600088>
 19. Beltrame T, Ferraresi C, Parizotto NA, Bagnato VS, Hughson RL. Light-emitting diode therapy (photobiomodulation) effects on oxygen uptake and cardiac output dynamics during moderate exercise transitions: a randomized, crossover, double-blind, and placebo-controlled study. *Lasers Med Sci.* 2018 Jul;33(5):1065–71.
 20. Ferraresi C, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? *J Biophotonics.* 2016 Dec;9(11–12):1273–99.
 21. de Oliveira AR, Vanin AA, Tomazoni SS, Miranda EF, Albuquerque-Pontes GM, De Marchi T, et al. Pre-Exercise Infrared Photobiomodulation Therapy (810 nm) in Skeletal Muscle Performance and Postexercise Recovery in Humans: What Is the Optimal Power Output? *Photomed Laser Surg.* 2017 Nov;35(11):595–603.

22. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ*. 2010 Mar;340:c332.
23. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2014;37(Supplement 1):S81--S90. Available from: https://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S81
24. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005 Apr;28(4):956–62.
25. Committee on Exercise - American Heart Association. Exercise testing and training of apparently healthy individuals: a handbook for physicians. 1972. p. 40.
26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412–9.
27. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* [Internet]. 2004 Jun 1;27(6):1487 LP – 1495. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/content/27/6/1487.abstract>
28. Milan-Mattos JC, de Oliveira Francisco C, Ferroli-Fabrcio AM, Minatel V, Marcondes ACA, Porta A, et al. Acute effect of photobiomodulation using light-emitting diodes (LEDs) on baroreflex sensitivity during and after constant loading exercise in patients with type 2 diabetes mellitus. *Lasers Med Sci*. 2020 Mar;35(2):329–36.
29. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jul;45(1):18–31.
30. Eduardo da Silva-Santos J, Assreuy J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Jul;290(1):380–7.
31. Paolillo FR, Arena R, Dutra DB, de Cassia Marqueti Durigan R, de Araujo HS, de Souza HCD, et al. Low-level laser therapy associated with high intensity resistance training on cardiac autonomic control of heart rate and skeletal muscle remodeling in wistar rats. *Lasers Surg Med*. 2014 Dec;46(10):796–803.
32. Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*. 2011;9(4):602–18.
33. Gavish L, Hoffer O, Rabin N, Halak M, Shkilevich S, Shayovitz Y, et al. Microcirculatory Response to Photobiomodulation-Why Some Respond and Others Do Not: A Randomized Controlled Study. Vol. 52, *Lasers in surgery and medicine*. United States; 2020. p. 863–72.
34. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang Y-Y, de Sousa MVP, Bagnato VS,

- et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol.* 2015;91(2):411–6.
35. Ferraresi C, Parizotto NA, Pires de Sousa MV, Kaippert B, Huang Y-Y, Koiso T, et al. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. *J Biophotonics.* 2015 Sep;8(9):740–54.
 36. Ferraresi C, de Sousa MVP, Huang Y-Y, Bagnato VS, Parizotto NA, Hamblin MR. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci.* 2015 May;30(4):1259–67.
 37. Ferraresi C, de Brito Oliveira T, de Oliveira Zafalon L, de Menezes Reiff RB, Baldissera V, de Andrade Perez SE, et al. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. *Lasers Med Sci.* 2011 May;26(3):349–58.
 38. Azzone GF, Carafoli E. Biochemical properties of skeletal muscle mitochondria: I. Oxidative phosphorylation. *Exp Cell Res* [Internet]. 1960;21(3):447–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482760902780>
 39. de Brito Vieira WH, Ferraresi C, Schwantes MLB, de Andrade Perez SE, Baldissera V, Cerqueira MS, et al. Photobiomodulation increases mitochondrial citrate synthase activity in rats submitted to aerobic training. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2018;33(4):803–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2424-2>
 40. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD, Costa LOP, Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2018 Jan;33(1):181–214.

ESTUDO 3

(versão em português com detalhamentos e inclusão de ilustrações)

“Efeito dose-resposta aguda da terapia por fotobiomodulação na dinâmica cardiorrespiratória e deoxigenação muscular em adultos com Diabetes Mellitus tipo 2: um estudo randomizado, cruzado, duplo-cego e controlado por sham”³

Stephanie Nogueira Linares, Thomas Beltrame, Maria Cecilia Moraes Frade; Gabriela Aguiar Mesquita Galdino, Juliana Cristina Milan-Mattos; Mariana de Oliveira Gois; Audrey Borghi-Silva; Priscila Faleiro de Biase; Fúlvia de Barros Manchado Gobatto; Vanderlei Salvador Bagnato Nivaldo Antônio Parizotto; Cleber Ferraresi; Aparecida Maria Catai

³ Será submetido ao periódico *Scientific Reports*

6.1 INTRODUÇÃO

O estudo da dinâmica do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) ao exercício físico é uma forma de análise de dados que descreve, em termos matemáticos, as características temporais da resposta aeróbia a um determinado aumento gradual na taxa de trabalho (\dot{W}). (1) Fisiologicamente, a dinâmica do $\dot{V}O_2$, que é avaliada durante protocolos de carga moderada constante e/ou randômica, tem sido relacionada à potência aeróbia, i.e, $VO_{2\text{pico/máx}}$. Estudos apontam que, quanto mais lento os ajustes do $\dot{V}O_2$, pior é a condição de saúde física e conseqüentemente, mais lenta é a capacidade do sistema aeróbico para ofertar e consumir o oxigênio (O_2) pelo tecido muscular. (1,2)

Estudos mostram que indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) apresentam um atraso na resposta do $\dot{V}O_2$ após o início de exercício de leve a moderada intensidade e apresentam fadiga muscular prematura e redução da tolerância ao exercício físico, o que está associado a um risco aumentado de desfechos cardiovasculares e mortalidade.(3–5) Além disso, evidências sugerem que esses possíveis mecanismos podem estar relacionados ao fato dos indivíduos com DM2 apresentarem um desequilíbrio entre a oferta e consumo de O_2 , o que, conseqüentemente, propicia uma diminuição do fluxo sanguíneo, e da densidade capilar, defeitos na difusão de oxigênio muscular, e prejuízo da função mitocondrial.(2,6,7)

Nesse cenário, a terapia por fotobiomodulação (TFBM), aparece como um importante recurso ergogênico, uma vez que proporciona aumento no metabolismo oxidativo mitocondrial. (8,9) Ainda, estudos comprovaram os seus benefícios na melhora da tolerância ao exercício físico (10), da função muscular (11,12) e de marcadores de danos muscular. (7,13,14)

Tendo em vista essa possível melhora ocasionada pela TFBM, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito dose-resposta aguda da TFBM associado a exercício de moderada intensidade composto por protocolo de carga constante (PCC) seguido por protocolo pseudorrandômico binário (PRBS) nas respostas hemodinâmicas e ajustes cardiorrespiratório em indivíduos com DM2. Nossa hipótese é de que a terapia por fotobiomodulação pode alterar o metabolismo mitocondrial, com conseqüente aumento na produção de ATP e melhor contração muscular. Sendo assim, acreditamos que a TFBM possa influenciar a

dinâmica do $\dot{V}O_2$, visto que uma maior energia associado a um protocolo de exercício moderado de maior duração, PCC seguido por PRBS, poderiam otimizar os ajustes do consumo de O_2 , oxigenação muscular e débito cardíaco, proporcionando uma maior tolerância ao exercício físico.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo e aspectos éticos

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, cruzado, duplo-cego e controlado por *sham*. Este estudo está de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) para pesquisas médicas envolvendo seres humanos e recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CAAE: 80989017.6.0000.5504) da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. O estudo foi realizado em conformidade com as normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos (Resolução 466 de 2012, Conselho Nacional de Saúde) e foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC, ID RBR-6vgmtb em 10/08/2018), seguindo a *Plataforma Internacional de Registro de Ensaios Clínicos da Organização Mundial de Saúde (OMS)*. Os dados foram coletados no período de junho de 2018 a fevereiro de 2020 e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Processos de randomização e cegamento

Por se tratar de um estudo cruzado e controlado por *sham*, as 6 energias (*sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J) foram randomizadas por meio de um site (<https://www.random.org/>). Os pesquisadores envolvidos na condução e/ou análise dos dados permaneceram cegos até o final do estudo e foram orientados a não informar os indivíduos qual a energia da TFBM seria irradiada em cada sessão.

Uma vez que a TFBM não induzia nenhum estímulo sensitivo nas energias irradiadas, ou seja, irritação da pele, calor ou frio, os indivíduos também foram cegos em relação a condição TFBM-efetiva ou TFBM-*sham*. Os

procedimentos de randomização e cegamento foram realizados de acordo com a Declaração do CONSORT 2010. (16)

População do estudo

Para o cálculo do tamanho da amostra, utilizamos a mesma variável de desfecho *mean normalized gain* (MNG) do $\dot{V}O_2$ reportada por Beltrame *et. al.* 2017(1) e 2018(13), que descreve a aptidão aeróbia utilizando o mesmo protocolo de exercício, em indivíduos saudáveis. O cálculo amostral se baseou nos dados obtidos na condição *sham* de Beltrame *et. al.* 2018(13), com um desvio padrão de 5,86 % (sendo % neste caso, a unidade do MNG), um *power* de 0,8 e uma diferença esperada após terapia por FBM de 14% ao redor da média de 34,15 % (detectada por teste *t* pareado). Os dados utilizados para o cálculo amostral possuem uma ampla faixa de diferentes níveis de aptidão e potência aeróbia, incluindo valores esperados em indivíduos com DM2. Adicionalmente, considerando uma perda esperada de ~ 30 % da amostra devido a possíveis problemas técnicos detectados apenas *a posteriori*, foram adicionados 4 voluntários ao cálculo amostral, totalizando 17 voluntários. Vale ressaltar que, devido às características de filtro intrínsecas ao cálculo do MNG, a sensibilidade às mudanças promovidas pela TFBM nos indivíduos com DM2 é elevada. Desta forma, espera-se que 17 voluntários sejam suficientes para detectar se a terapia por FBM influencia ou não a aptidão aeróbia em indivíduos com DM2.

Foram incluídos voluntários do gênero masculino, com idade entre 40 e 64 anos, com diagnóstico de Diabetes *Mellitus* tipo 2 de acordo com as recomendações da *American Diabetes Association*.(17) Indivíduos com os seguintes critérios foram excluídos do estudo: neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) (avaliado por meio de três testes autonômicos específicos de acordo com Boulton et al.(18)), índice de massa corpórea (IMC) maior ou igual a 35 kg/m² (obesidade grau II e III), espessura da gordura subcutânea do músculo vasto lateral e do tríceps sural maior que 45 mm; alterações eletrocardiográficas (ECG), como anormalidade do segmento ST (elevação ou depressão), isquemia, bloqueio de ramo cardíaco direito ou esquerdo, ou arritmias em ECG de repouso ou induzidas por teste de exercício cardiopulmonar

(TECP); fumantes, etilistas, usuários de drogas ilícitas ou medicamentos que pudessem influenciar o padrão de respostas das variáveis estudadas; indivíduos com classificação funcional aeróbia boa ou excelente, de acordo com a *American Heart Association*(19) e indivíduos com disfunções respiratórias, neurológicas ou osteomioarticular que impossibilitem a execução do protocolo experimental.

Avaliações clínicas

Para a caracterização da amostra, foram realizadas avaliações clínicas (Figura 1a), de análises bioquímicas e após um intervalo de 48 horas, um teste de exercício cardiopulmonar (TECP) foi realizado na presença de um cardiologista.

As análises bioquímicas foram compostas por hemoglobina glicada (HbA1c), nível de insulina e glicemia de jejum (de 10 a 12 horas de jejum), realizados por meio do analisador *ADVIA 1800 Chemistry System (Siemens, Tarrytown, NY, EUA)*. O grau de sensibilidade à insulina foi determinado no início do estudo pelo *homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)*.(20)

A fim de garantir que a espessura da gordura subcutânea do músculo vasto lateral (VL) e do tríceps sural, local em que o optodo do equipamento de *near infrared spectroscopy (NIRS)* foi posicionado, fosse menor que 45 mm, avaliamos a adiposidade utilizando um aparelho de ultrassonografia (US) (*M-Turbo Ultrasound System, FujifilmSonoSite, Bothell, WA, EUA*). Essa espessura foi estabelecida com base na profundidade de penetração do equipamento NIRS e na distância entre os optodos que foram utilizados sobre o músculo de interesse.(21) Desta forma, os dados obtidos pela NIRS foram referentes ao tecido muscular vasto lateral e tríceps sural.

Teste de exercício cardiorrespiratório (TECP)

O TECP foi utilizado para avaliar a potência aeróbia dos participantes por meio da obtenção do consumo de oxigênio pico ($\dot{V}O_{2-pico}$) (22) e do $\dot{V}O_2$ no limiar de anaerobiose ventilatório (LAv). O protocolo foi composto por 1 minuto de repouso no cicloergômetro, seguido por 3 minutos de exercício com carga livre e posterior incremento de carga a cada minuto. O incremento da potência foi

calculado para cada participante de acordo com os valores estabelecidos pela fórmula descrita por Wasserman *et al.* (23)

Durante todo o protocolo, os voluntários foram orientados a manterem a cadência em 60 ± 5 rotações por minuto (rpm). Três avaliadores independentes determinaram o LAV pelo método ventilatório padrão com suporte do Método V-Slope seguindo literatura prévia. (24,25) O maior valor do $\dot{V}O_2$ obtido nos últimos 30 segundos do TECP foi considerado como $\dot{V}O_{2-pico}$. (22)

Delineamento do estudo e protocolo experimental

Todos os participantes realizaram nove encontros, sendo os três primeiros destinados a uma avaliação inicial. Após esta triagem inicial, cada participante foi submetido a seis sessões denominadas experimental como mostrados na Figura 1.B. No dia anterior a cada protocolo, os indivíduos foram orientados a evitarem exercícios vigorosos, e ingestão de álcool e cafeína.

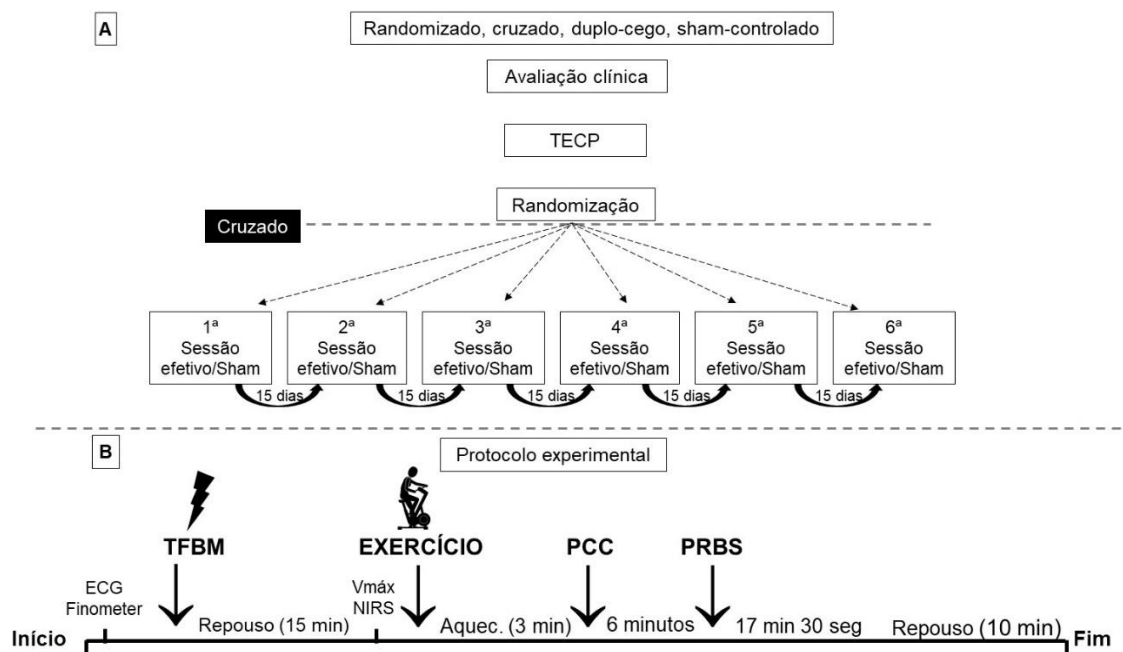


Figura 1. Desenho experimental. **(A)** O primeiro dia foi destinado à realização da coleta de dados iniciais (anamnese). No segundo dia, o voluntário realizou exame de sangue e avaliação antropométrica. Após um intervalo de 48 horas, foi submetido a um teste de exercício cardiopulmonar (TECP) em ciclo ergômetro. E após 72 horas, iniciou o protocolo experimental. As sessões tiveram intervalo de 15 dias a fim de garantir o período de *washout* da TFBM. **(B)** Assim que o voluntário chegava, era posicionado o eletrocardiograma (ECG) de 3 derivações e o Finometer. Imediatamente após, era aplicada a terapia por fotobiomodulação, podendo ser TFBM-efetivo ou TFBM-sham. Após 15 minutos da irradiação, foram colocados os optados da NIRS nos músculos vasto lateral e tríceps sural no membro inferior direito e uma máscara acoplada ao pneumotacógrafo ($V_{máx}$). Após a colocação dos equipamentos, o voluntário iniciou o exercício composto pelo protocolo de carga constante (PCC) seguido por protocolo pseudorrandômico binário (PRBS). Finalizando o exercício, o voluntário permaneceu por 10 minutos em repouso, sentado em uma cadeira.

Na visita denominada protocolo experimental, antes de cada sessão, por questão de segurança, a glicemia dos voluntários era mensurada por meio de um glicosímetro (marca *Accu-Chek® Active*). Os procedimentos experimentais foram realizados no período da manhã, com os pacientes em vigência dos fármacos prescritos. Após, o voluntário recebia as devidas orientações a respeito da avaliação do dia e familiarizado quanto aos equipamentos utilizados.

Imediatamente após a colocação dos equipamentos, eletrocardiograma (ECG) e *Finometer*, foi aplicada a terapia por FBM, TFBM-efetivo ou TFBM-*sham* (com energias randomizadas). Na sequência, o voluntário realizou um aquecimento em carga livre por 3 minutos e um protocolo de carga constante (PCC), por um tempo de 6 minutos à 80% do limiar de anaerbiose ventilatória (LAv), atingido em TECP prévio, seguido pelo protocolo pseudorrandômico binário (PRBS), por 17 minutos e 30 segundos, composto por 20 estágios que oscilavam a 20 e 80% do LAv. Vale destacar que o protocolo PRBS estimula a resposta aeróbia de modo realista quando comparado aos protocolos laboratoriais de degrau descontínuo, pois alternam a potência entre dois níveis de forma randômica, ou seja, simulam o que é esperado durante uma atividade de vida diária.(15)

Após a execução de todo o protocolo experimental, o voluntário permaneceu em repouso por 10 minutos. Um exemplo do PCC seguido por PRBS está na Figura 2.

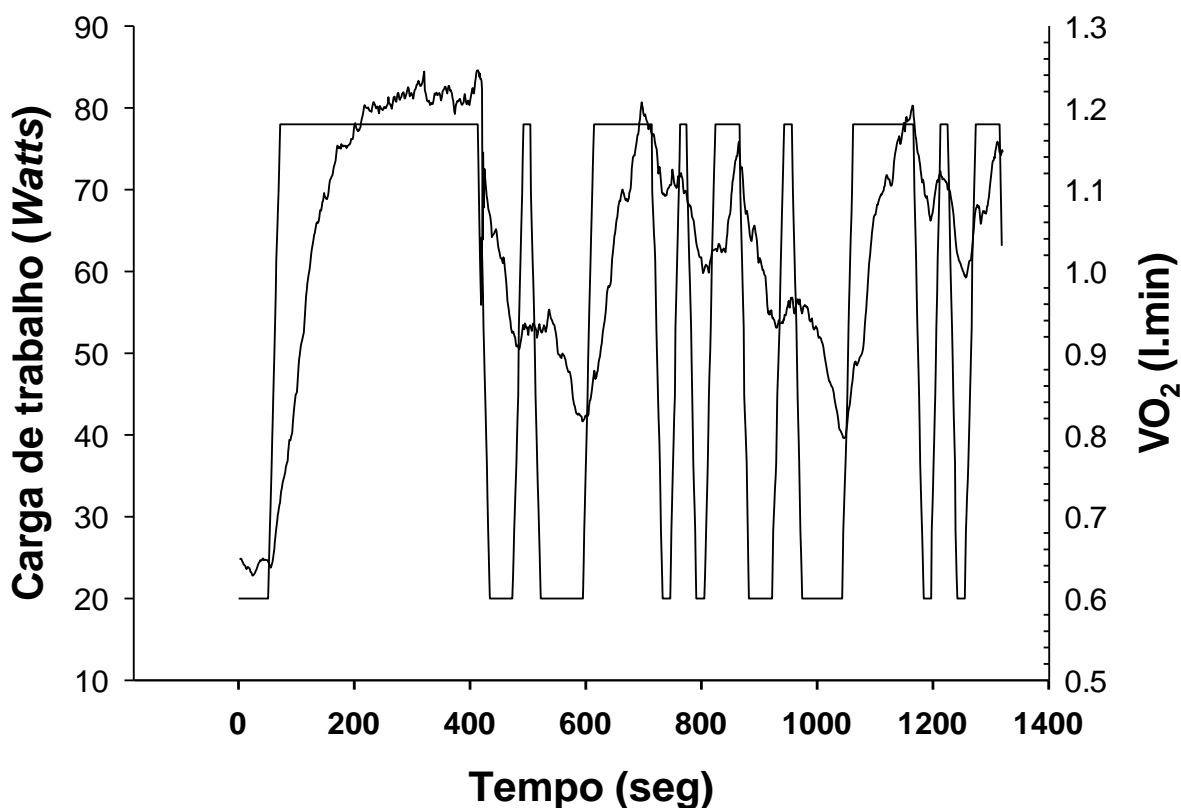


Figura 2. Ilustração da resposta do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) durante o protocolo experimental composto por um protocolo de carga constante (PCC) seguido por protocolo pseudorrandômico binário (PRBS). O PCC foi realizado por 6 minutos com carga (trabalho em watts) correspondente a 80% do LAV. O PRBS era composto por 20 estágios, sendo as cargas definidas de acordo com a carga no LAV. Os dois níveis de potência escolhidos (20 e 80% do LAV) são considerados como exercício moderado, ou seja, abaixo do LAV, de maneira a respeitar o princípio da linearidade estática. O degrau mais intenso correspondia a 80% da carga no LAV e o degrau menos intenso, 20% da carga do LAV.

Terapia por fotobiomodulação por meio de diodos emissores de luz (LED)

O equipamento é um protótipo não comercial (Patente INPI PI11037105) composto por um material maleável de 34x18 centímetros (Figura 3.) desenvolvidos por duas universidades brasileiras: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar e Universidade de São Paulo - Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP). (7,26)



Figura 3. Equipamento para terapia por fotobiomodulação, composta por 50 diodos emissores de luz (LEDs) com comprimento de onda de 850 ± 20 nm, potência de 75mW e área do feixe de saída de $0,20\text{cm}^2$ em cada LED.

O equipamento é composto por uma matriz de 50 LEDs do tipo Arseneto de Gálio e Alumínio (Ga-Al-As), com comprimento de onda de 850 ± 20 nm, potência de 75mW cada diodo. A cada sessão, a TFBM era aplicação em contato direto sobre a pele do voluntário primeiramente nos músculos reto e oblíquo do abdome, seguido pelo músculo quadríceps femoral, tríceps sural e por fim, os isquiotibiais, bilateralmente (Figura 4.).

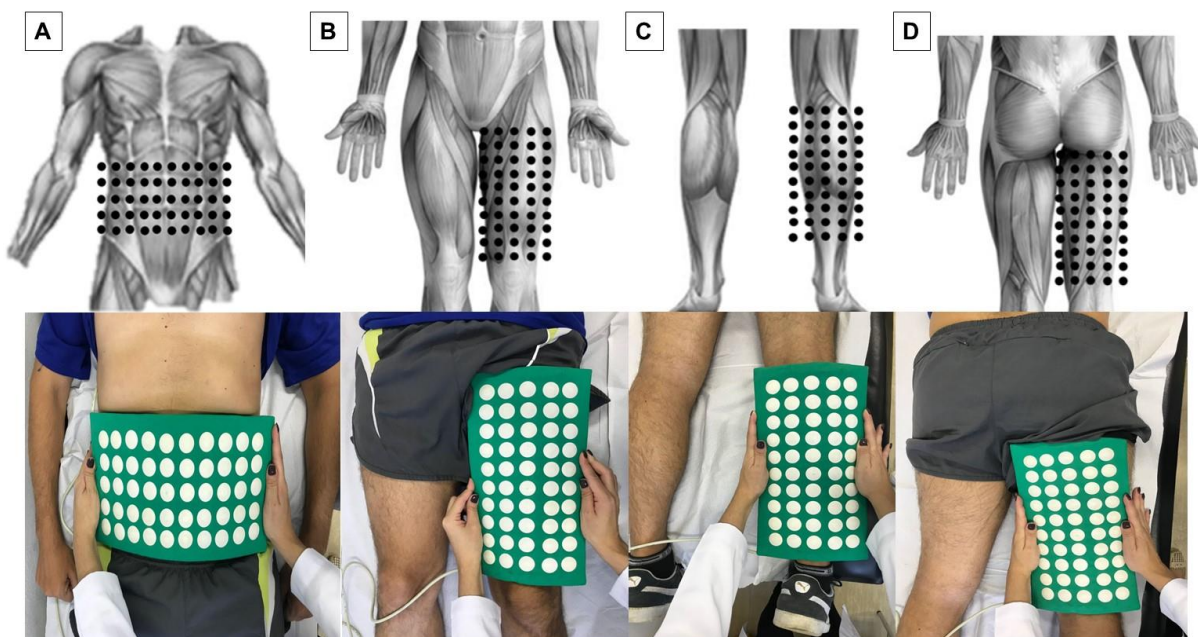


Figura 4. Áreas de aplicação da terapia por fotobiomodulação por meio de LED. **(A)** músculo reto e oblíquo do abdômen; **(B)** quadríceps; **(C)** tríceps sural e **(D)** isquiotibiais.

Os parâmetros utilizados para as 6 diferentes energias (*sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J) aplicadas sobre as áreas estão descritas na Tabela 1. Para a energia *sham*, seguimos os mesmos procedimentos, porém, com o dispositivo desligado por um botão oculto.

Tabela 1. Parâmetros da terapia por fotobiomodulação e locais de irradiação

Parâmetros de irradiação						
Tipo de TFBM	Diodo semiconductor de Ga-Al-As					
Quantidade de pontos / LEDs	50					
Comprimento de onda	850 ± 20 nm					
Frequência	Saída contínua					
Potência	75 mW por diodo					
Área de saída de cada diodo	0,2 cm ²					
Energia por diodo	0 J, 1,5 J, 3 J, 6 J, 9 J, 12 J					
Densidade de potência por diodo	0 ou 375 mW/cm ²					
Área total	612 cm ²					
Modo de aplicação	Contato direto					
	<i>Sham</i>	75 J	150 J	300 J	450 J	600 J
Tempo de tratamento por músculo (seg)	80	20	40	80	120	160
Energia total irradiada por músculo	0 J	75 J	150 J	300 J	450 J	600 J
Tempo total (seg.)	560	140	280	560	840	1.120
Energia total entregue (4 regiões)	0 J	525 J	1.050 J	2.100 J	3.150 J	4.200 J

TFBM: terapia por fotobiomodulação; **Ga-Al-As:** arseneto de gálio-alumínio; **LED:** diodo emissor de luz; **nm:** nanômetros; **mW:** milliwatts; **cm²:** centímetro ao quadrado; **J:** joules; **mW/cm²:** milliwatts por centímetro ao quadrado; **seg:** segundos.

O dispositivo foi periodicamente calibrado por meio de um medido de energia óptica (*PM100D Thorlabs®*, *Newton, New Jersey, EUA*), conectado a um sensor de luz S130C (área de 0,7 cm²) para garantir que a potência correta de luz e energia fossem fornecidas. (26)

Durante a coleta dos dados, os indivíduos foram orientados a não falarem desnecessariamente e a respirar de forma espontânea.

Coletas de dados

A frequência cardíaca (FC) foi obtida a partir do sinal de um ECG (*BioAmp Power Lab – Ad Instruments, Castle Hill, NSW, Austrália*). Adicionalmente, a pressão arterial do dedo foi medida por um aparelho de fotopletismografia, Finometer PRO (*Finapres Medical Systems, Holanda*) acoplado ao terceiro dedo da mão esquerda posicionada ao nível do coração. Ainda, baseado no *ModelFlow* (27), o débito cardíaco (\dot{Q}) foi estimado baseado na onda de pressão arterial. Todos estes sinais foram integrados em um sistema de aquisição com taxa amostral de 1000 Hz (*PowerLab 8/35, AD Instruments, Austrália*). A coleta dos gases expirados foi feita por meio de uma máscara acoplada ao pneumotacógrafo e o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e a razão de troca respiratória (RER) foram mensuradas durante todo o protocolo experimental, respiração a respiração por um carro metabólico (*Vmax29, Sensor Medics, Yorba Linda, CA, EUA*) (Figura 5). Previamente a sessão, foi feita a calibração de fluxo e gases conforme o fabricante.

As variáveis de oxigenação do músculo vasto lateral (VL) e tríceps sural foram medidas utilizando o equipamento NIRS (*Oxymon System, Artinis Medical Systems, Holanda*). A NIRS é um método não invasivo, que monitora a oxigenação muscular em tempo real e conseqüentemente consegue avaliar a microcirculação muscular. Esse equipamento emite uma luz que é absorvida pelo cromóforo que emite fótons que são captados pelos optodos da NIRS. As concentrações relativas dos cromóforos se relacionam com a quantidade de fótons por eles emitidos. Os optodos com o gerador e o detector de luz foram fixados no ventre do músculo VL direito, cerca de 12 a 15 cm da articulação do joelho, na linha lateral entre o trocânter maior do fêmur e a patela e, no ventre do músculo tríceps sural. Ainda, os optodos foram protegidos da luz ambiente

por meio de tecido escuro a fim de evitar interferências. Os dados da NIRS foram coletados a uma frequência de 250 Hz e a distância inter-optodos estabelecida foi de 45 mm.

A calibração era realizada a cada indivíduo de acordo com as instruções do fabricante, e os dados foram captados continuamente durante o protocolo experimental. Para cada músculo, a mudança da oxigenação tecidual e do volume de sangue local foram estimados pelas mudanças nas concentrações relativas da deoxihemoglobina (DHb) e pelo índice de saturação tecidual (IST).

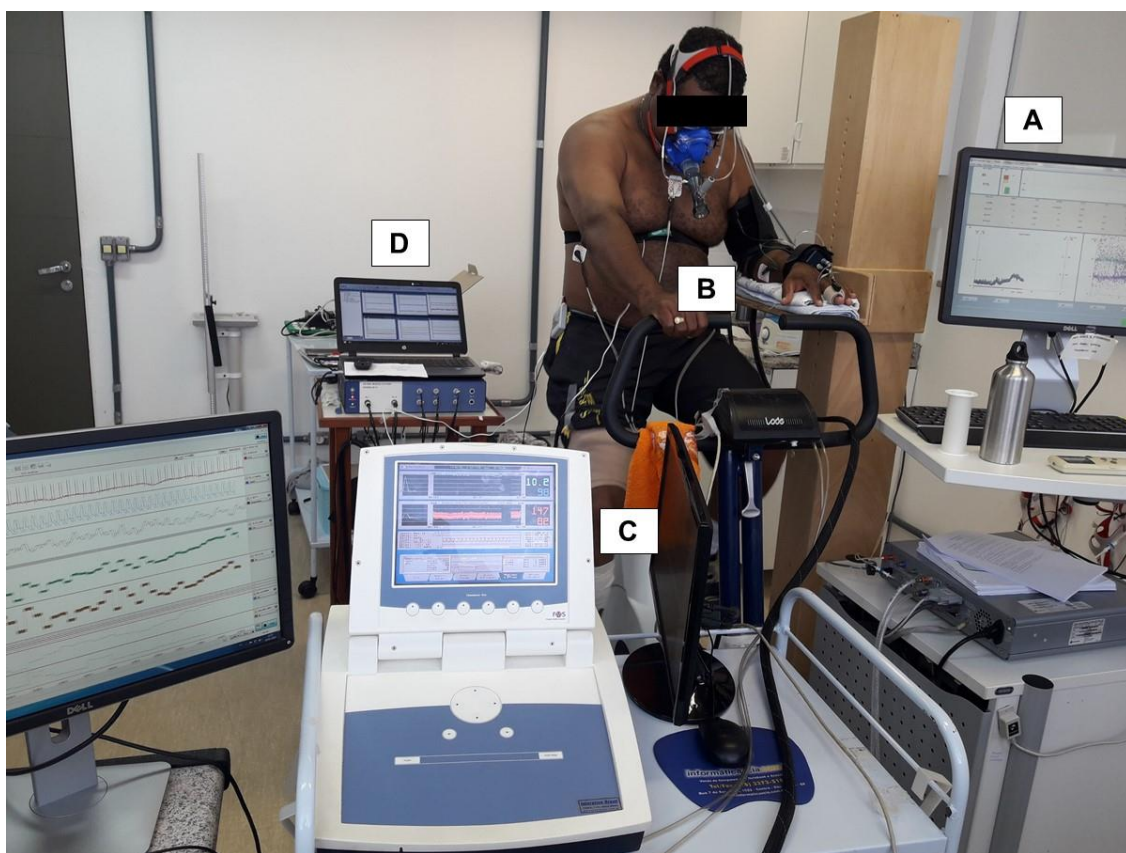


Figura 5. Ilustração da aquisição dos dados experimentais durante o protocolo experimental em cicloergômetro. Em **A**, um sistema metabólico acoplado a uma máscara foi utilizado para a estimativa das oscilações nas concentrações dos gases O_2 e das mudanças na ventilação pulmonar ao nível da boca. Em **B**, um sistema de eletrocardiografia foi utilizado para estimar a frequência cardíaca a partir das oscilações no potencial elétrico entre os ciclos cardíacos. Em **C**, um sistema de fotopletismografia foi utilizado para a estimativa do débito cardíaco baseado na morfologia da onda de pressão de pulso do terceiro dedo da mão. Em **D**, um equipamento *near-infrared spectroscopy* (NIRS) foi utilizado para avaliar a estimativa das mudanças da concentração da deoxihemoglobina do vasto lateral e tríceps sural.

Processamento e análise dos sinais

Sincronismo, filtros e interpolação

Após coleta dos dados, o registro de todas as variáveis coletadas foi exportado a 1Hz, exceto os dados referentes ao sistema metabólico que foram exportados respiração-a-respiração. O comportamento das variáveis durante o protocolo experimental foi analisado em um *software* desenvolvido para tal finalidade e já utilizado em estudos prévios.(3,13,15) Este *software*, implementado em linguagem *LabVIEW* (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*), integra os sinais coletados, aplica técnicas de pré-processamento (filtros e eliminação de outliers), além de interpolar, segundo-a-segundo os dados do sistema metabólico. Como mostrado na Figura 6., o *software* permite o janelamento dos dados (por meio de cursores), a aplicação de filtro de média móvel, e a eliminação de *outliers* seguindo literatura pertinente. (28)

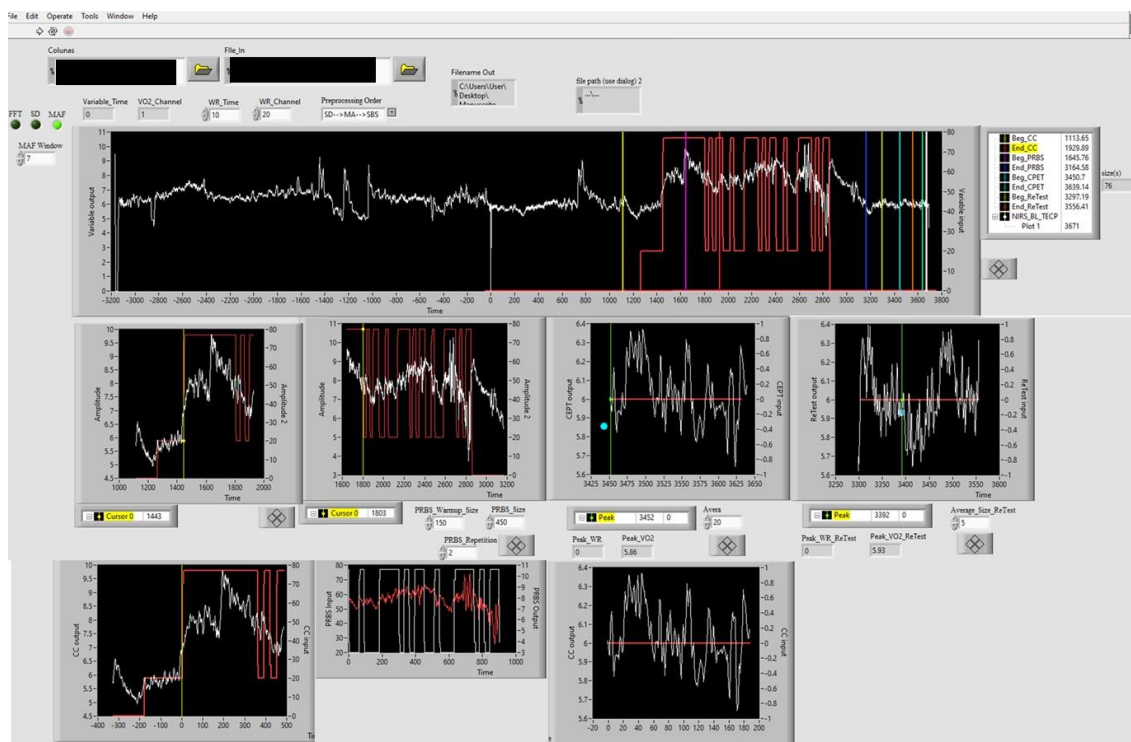


Figura 6. Software em linguagem *LabVIEW* para a sincronização, filtro e análise inicial dos dados de forma integrada. A sincronização foi realizada por uma marcação comum entre todos os equipamentos utilizados nos experimentos, e o filtro é composto por média móvel e eliminação de outliers.

Análise no domínio da frequência

Para a análise do domínio da frequência, os sinais relacionados aos primeiros 150 segundos do PRBS inicial foram excluídos para diminuir a influência das transições do PCC para o PRBS na estabilidade do sinal. (29) Os dados do PRBS foram interpolados segundo a segundo, alinhados ao tempo e, em seguida, calculada a média para obter uma única resposta PRBS para cada protocolo experimental (TFBM-efetivo ou TFBM-*sham*).

A análise no domínio da frequência foi aplicada em uma série temporal de dados de \dot{Q} , FC, $\dot{V}O_2$, DHb e IST segundo a segundo. A Transformação Rápida de *Fourier* foi usada para ajustar os dados para cada frequência específica, a fim de obter a melhor função senoidal de acordo com:

$$DC, FC, \dot{V}O_2, DHb \text{ e IST} \cdot (t) = \alpha_{BL}$$

$$+ 2 * \sum_{n=1}^6 (A_n * \cos(2\pi * n * f_1 * t) + B_n * \sin(2\pi * n * f_1 * t))$$

Onde " α_{BL} " é o valor médio, " n " é a quantidade de harmônicas (número inteiro de 1 a 6), " f_1 " é a frequência fundamental (1/450 Hz neste caso) e " A_n " e " B_n " são as amplitudes do cosseno e do seno, respectivamente. A partir de " A_n " e " B_n ", a amplitude total foi calculada para cada frequência a partir da fórmula $Amp = \sqrt{A_n^2 + B_n^2}$. A dinâmica temporal, definida como a rapidez com que a variável está se adaptando durante as transições de exercício, foi calculada com base em estudos anteriores. (1,3) Resumindo, o *mean normalized gain* (MNG, em %) foi usado como um índice que caracteriza a velocidade da dinâmica da resposta durante as oscilações das cargas durante o PRBS. Tal índice (MNG) utiliza como base o parâmetro *Amp* ao longo das frequências analisadas obtido por análise no domínio da frequência.

Análise estatística

A análise de intenção de tratar das variáveis hemodinâmicas foram realizadas pelo método de imputação de valores para todos os dados ausentes. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão. Todas as variáveis obtidas nos

diferentes momentos e energias foram dentro do grupo (basal e estado estável) e entre os grupos (sham, 75, 150, 300, 450 e 600 J) por meio da análise de variância (ANOVA) *one way* de medidas repetidas para dados paramétricos. E para os dados não paramétricos, utilizamos o teste de *Kruskal-Wallis e Friedman*. O teste de *Tukey* foi utilizado como um teste *post-hoc* quando eram encontradas interações significativas. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados no *Software SigmaPlot* versão 14.0 (*Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA*).

6.3 RESULTADOS

Foram considerados elegíveis 104 sujeitos (Figura 7.), dos quais 90 foram excluídos devido aos critérios de exclusão. As características dos indivíduos incluídos estão resumidas na Tabela 2. Todos os indivíduos faziam uso de medicamentos para o controle da hiperglicemia. Não houve mudanças nos medicamentos e no estilo de vida durante os protocolos experimentais. A Tabela 2 mostra as características clínicas e laboratoriais dos indivíduos.

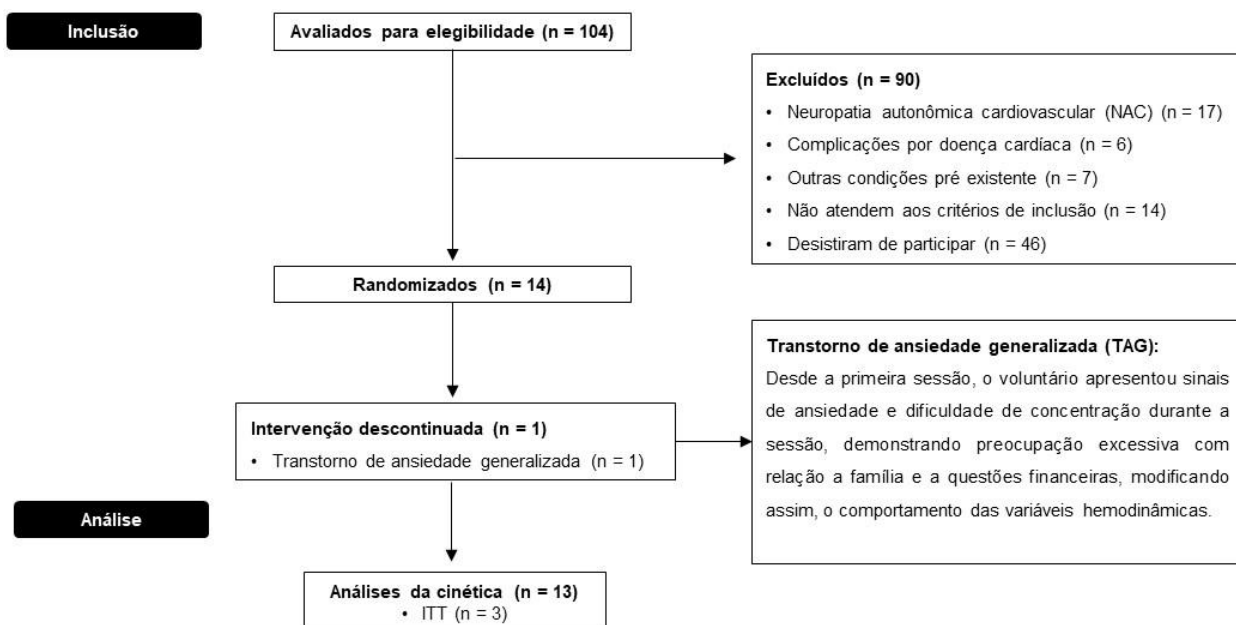


Figura 7. Fluxograma. Um total de 104 indivíduos atenderam os critérios de inclusão e foram avaliados no período de junho de 2018 a fevereiro de 2020. Noventa indivíduos foram excluídos devido aos critérios de exclusão, sendo eles: dezessete com NAC; seis com complicações de doença cardíaca; sete com outras condições pré-existentes; quatorze não preencheram os critérios de inclusão e quarenta e seis por abandono devido a longos períodos de avaliação, porém, antes da randomização. No total, 14 sujeitos foram randomizados, sendo um excluído por TAG. No total, 10 indivíduos completaram o estudo e 3 foram incluídos na análise por intenção de tratar (ITT).

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais (n = 13)

Idade (anos)	52,7 ± 7,1
Características antropométricas	
Peso corporal (Kg)	91,0 ± 10,8
IMC (Kg/m ²)	29,3 ± 2,9
Camada de gordura do M. vasto lateral (mm)	0,41 ± 0,18
Características clínicas	
Tempo de diabetes (anos)	12,7 ± 7,3
VO ₂ pico (ml/kg/min)	25 ± 4,2
VO ₂ LA _v (ml/kg/min)	14 ± 4
Carga máxima (Watts)	161 ± 24
Carga de trabalho no LA _v (Watts)	87 ± 22
Carga de trabalho do PCC (Watts)	70 ± 18
Carga de trabalho do PRBS a 20% do LA _v (Watts)	18 ± 5
Carga de trabalho do PRBS a 80% do LA _v (Watts)	70 ± 18
FC de repouso (bpm)	75,1 ± 10,0
PAS de repouso (mmHg)	126,7 ± 6,8
PAD de repouso (mmHg)	72,2 ± 3,3
Exames laboratoriais	
HbA _{1c} (%)	7,8 ± 1,8
Insulina de jejum (µU/ml)	15,6 ± 14,1
Glicemia de jejum (mg/dL)	180,1 ± 42,3
Sensibilidade à insulina (% HOMA)	4,0 ± 2,1
Fármacos (n, (%))	
Insulina	3/13
Hipoglicêmico oral	13/13
Biguanidas	13
Sulfonilureias	3
Glitazonas	3
Inibidores SGLT2	1
Anti-hipertensivo	8/13
Diuréticos	4
Bloqueadores de receptor AT ₁	8
Hipercolesterolemia	4/13
Fibrato	1
Estatina	4
Reposição de T4	1/13
Inibidores de enzima	1/13

Valores expressos em média ± desvio padrão (DP); **Kg**: quilograma; %: porcentagem; **IMC**: índice de massa corporal; **Kg/m²**: quilograma por metro quadrado; **mm**: milímetros; **VO₂máx**: volume máximo de oxigênio; **ml. kg. min**: mililitro por quilograma de peso por minuto; **FC**: frequência cardíaca; **bpm**: batimento por minuto; **PAS**: pressão arterial sistólica; **mmHg**: milímetros de mercúrio; **PAD**: pressão arterial diastólica; **HbA_{1c}**: hemoglobina glicada; **µU/ml**: microunidades por mililitro; **mg/dL**: miligrama decilitro; **HOMA**: avaliação da homeostase da resistência à insulina; **SGLT2**: cotransportador sódio-glicose 2; **Receptor AT₁**: receptor de angiotensina 1; **T4**: tetraiodotironina.

Conforme observado na Figura 8, a comparação entre as energias 600 e 75 J revelou diferença estatística ($p < 0,014$) na dinâmica (MNG) do \dot{Q} (Tabela 3). E quando comparado o estado estável ao momento basal (Figura 10), observamos que o \dot{Q} , FC, $\dot{V}O_2$, RER, *DHb* do vasto lateral e do tríceps sural aumentaram em todas as energias ($p < 0,05$) e o *IST* do músculo vasto lateral reduziu ($p < 0,05$). Para as demais variáveis, não observamos diferenças (Figura 9)

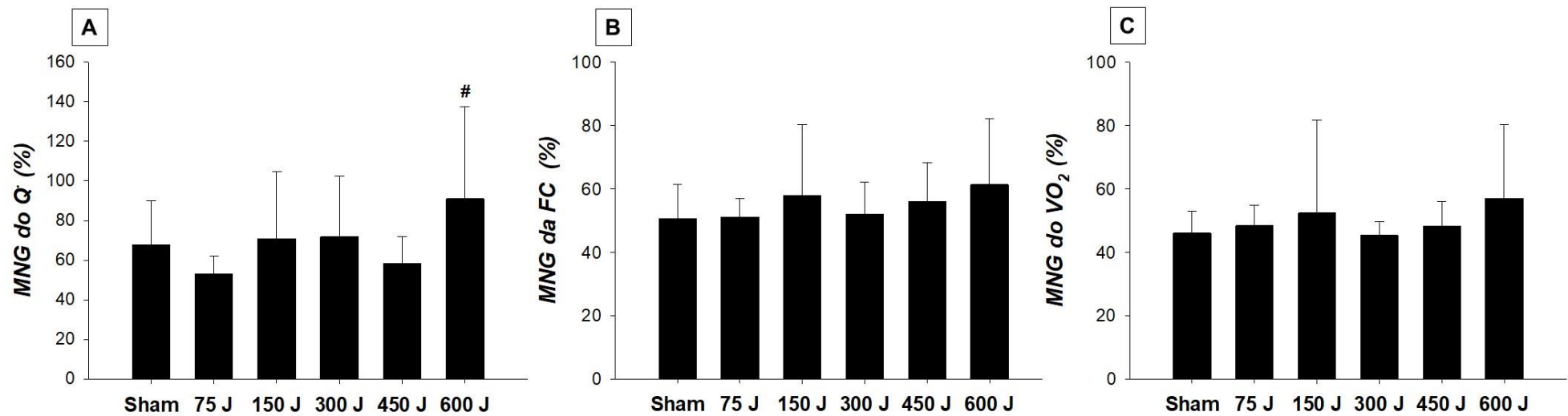


Figura 8. Magnitude das variações na dinâmica do MNG para as energias *sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J, em **(A)**: MNG do débito cardíaco (\dot{Q}), **(B)**: MNG da frequência cardíaca (FC) e **(C)**: MNG do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$).

[#]: $p < 0,05$ quando comparada as energias de 600 com 75J.

Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis metabólicas, hemodinâmicas e ventilatórias nas energias *sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J

	<i>Sham</i>	75J	150J	300J	450J	600J
\dot{Q} (n = 13)						
Basal (L/min)	10,8 ± 2,8	10,6 ± 1,7	11,4 ± 2,4	11,0 ± 2,3	10,6 ± 2,3	10,5 ± 2,3
Estado estável (L/min)	14,1 ± 3,4 *	14,4 ± 2,5 *	15,4 ± 3,1 *	14,7 ± 3,1 *	14,1 ± 2,9 *	13,9 ± 3,1 *
Δ das respostas pós CC (L/min)	3,26 ± 1,36	3,74 ± 1,22	4,00 ± 1,00	3,72 ± 1,15	3,43 ± 1,33	3,42 ± 1,29
MNG (%)	67,8 ± 22,2	53,1 ± 8,8	70,8 ± 33,8	71,8 ± 30,7	58,4 ± 13,5	90,9 ± 46,5 #
FC (n = 13)						
Basal (bpm)	87 ± 11	86 ± 10	85 ± 10	87 ± 8	85 ± 11	85 ± 10
Estado estável (bpm)	111 ± 11 *	109 ± 13 *	106 ± 14 *	110 ± 9 *	107 ± 15 *	107 ± 13 *
Δ das respostas pós CC (bpm)	23 ± 7	22 ± 6	21 ± 6	23 ± 6	22 ± 7	22 ± 7
MNG (%)	50 ± 10	51 ± 5	57 ± 22	51 ± 10	55 ± 12	61 ± 20
VO₂ (n = 13)						
Basal (L/min)	0,63 ± 0,12	0,61 ± 0,06	0,60 ± 0,06	0,61 ± 0,07	0,60 ± 0,12	0,58 ± 0,08
Estado estável (L/min)	1,24 ± 0,23 *	1,23 ± 0,19 *	1,20 ± 0,20 *	1,23 ± 0,19 *	1,22 ± 0,25 *	1,17 ± 0,21 *
Δ das respostas pós CC (L/min)	0,61 ± 0,19	0,62 ± 0,16	0,59 ± 0,17	0,62 ± 0,18	0,62 ± 0,22	0,59 ± 0,18
MNG (%)	46,0 ± 6,9	48,4 ± 6,3	52,3 ± 29,3	45,3 ± 4,4	48,1 ± 7,7	57,0 ± 23,1
VO₂/Kg (n = 13)						
Basal (ml/kg/min)	7,07 ± 1,05	6,86 ± 0,55	6,77 ± 0,82	6,89 ± 0,52	6,68 ± 1,13	6,61 ± 0,78
Estado estável (ml/kg/min)	13,9 ± 2,8 *	13,9 ± 2,4 *	13,5 ± 2,8 *	14,0 ± 2,5 *	13,6 ± 2,8 *	13,5 ± 2,8 *
RER (n = 13)						
Basal	0,85 ± 0,05	0,87 ± 0,05	0,84 ± 0,04	0,85 ± 0,05	0,85 ± 0,05	0,85 ± 0,06
Estado estável	1,01 ± 0,04 *	1,01 ± 0,05 *	0,99 ± 0,04 *	1,02 ± 0,04 *	1,01 ± 0,04 *	1,01 ± 0,05 *
Δ das respostas pós CC	0,16 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,17 ± 0,05	0,16 ± 0,06	0,16 ± 0,05
MNG (%)	73,6 ± 18,2	92,6 ± 33,6	77,3 ± 24,2	93,1 ± 43,5	85,0 ± 42,9	109 ± 109,9
IST do músculo vasto lateral (n = 13)						
Basal (%)	59,1 ± 3,6	66,6 ± 12,4	59,8 ± 5,0	60,2 ± 4,0	63,1 ± 7,4	60,8 ± 4,4
Estado estável (%)	53,6 ± 3,9 *	62,2 ± 16,3 *	53,4 ± 6,6 *	54,5 ± 4,5 *	55,6 ± 11,5 *	53,9 ± 6,5 *
Δ das respostas pós CC	-5,4 ± 4,9	-4,3 ± 7,0	-6,4 ± 4,4	-5,6 ± 2,9	-7,5 ± 6,9	-6,8 ± 3,4
MNG (%)	59,8 ± 16,5	76,7 ± 13,4	78,9 ± 26,1	77,6 ± 29,2	74,4 ± 22,9	70,9 ± 20,8
DHb do músculo vasto lateral (n = 13)						
Basal (%)	4,4 ± 7,8	5,3 ± 9,0	9,3 ± 15,9	5,7 ± 11,3	5,1 ± 11,9	7,2 ± 12,4
Estado estável (%)	11,4 ± 8,5 *	12,5 ± 9,6 *	16,2 ± 18,5 *	11,9 ± 13,0 *	13,0 ± 12,1 *	13,9 ± 14,8 *
Δ das respostas pós CC	7,0 ± 2,9	7,2 ± 3,1	6,9 ± 4,3	6,2 ± 2,8	7,9 ± 4,9	6,7 ± 3,8
MNG (%)	63,8 ± 15,6	65,8 ± 7,0	69,8 ± 18,3	65,2 ± 10,2	65,3 ± 10,2	68,5 ± 25,2
IST do músculo tríceps sural (n = 13)						
Basal (%)	63,4 ± 2,6	67,2 ± 12,1	61,8 ± 5,1	62,1 ± 3,4	63,7 ± 6,7	63,4 ± 5,3
Estado estável (%)	62,7 ± 3,9	66,6 ± 13,4	61,1 ± 5,2	61,0 ± 4,6	63,0 ± 7,0	63,4 ± 6,2
Δ das respostas pós CC	-0,7 ± 2,9	-0,6 ± 2,9	-0,6 ± 2,5	-1,0 ± 2,1	-0,6 ± 2,4	0,0 ± 1,9
MNG (%)	108,6 ± 68,7	126,4 ± 83,5	127,4 ± 128,7	80,7 ± 38,1	108,0 ± 66,3	101,6 ± 98,2
DHb do músculo tríceps sural (n = 13)						
Basal (%)	3,9 ± 13,8	1,4 ± 13,4	9,2 ± 19,9	4,4 ± 15,5	5,7 ± 15,4	6,0 ± 22,8
Estado estável (%)	6,9 ± 12,9 *	4,2 ± 13,2 *	12,0 ± 20,3 *	7,9 ± 15,5 *	9,0 ± 15,3 *	8,9 ± 22,3 *
Δ das respostas pós CC	2,9 ± 1,4	2,7 ± 1,5	2,7 ± 1,6	3,4 ± 0,8	3,2 ± 2,1	2,9 ± 1,5
MNG (%)	61,2 ± 16,6	77,7 ± 29,3	90,7 ± 42,2	61,3 ± 21,7	87,0 ± 36,6	84,6 ± 35,0

Valores expressos em média ± desvio padrão (DP); **DC**: débito cardíaco; **L**: litros; **ΔμM**: delta micro mols; **MNG**: *mean normalized gain*; %: porcentagem; **FC**: frequência cardíaca; **bpm**: batimento por minuto; **VO₂**: consumo de oxigênio por minuto, em litros; **l. min**: litro por minuto; **VO₂/Kg**: consumo de oxigênio por minuto; **ml. kg. min**: mililitro por quilograma de peso corpóreo por minuto; **RER**: razão de troca respiratória; **IST**: índice de saturação tecidual; **DHb**: deoxihemoglobina.

*: $p < 0,05$ quando comparado ao momento basal.

#: $p < 0,05$ quando comparada as energias de 600 com 75J.

†: $p < 0,05$ quando comparada as energias de 75J com *sham*.

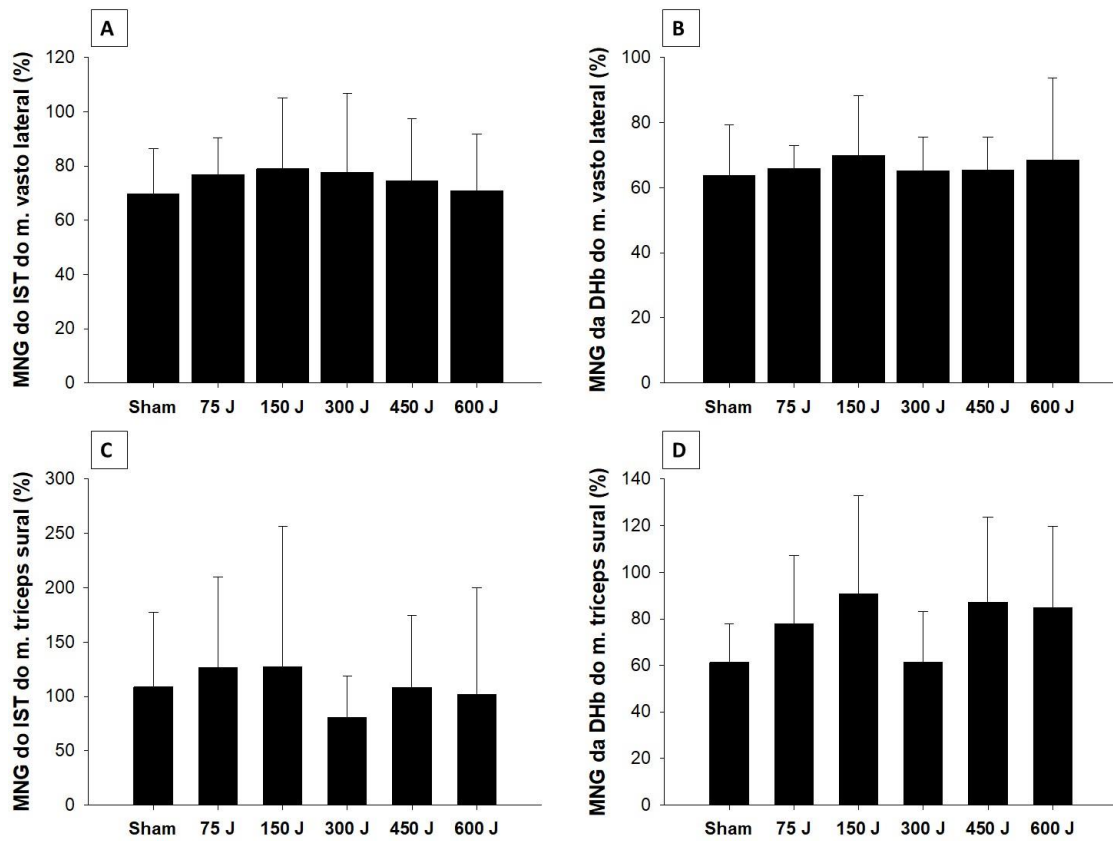


Figura 9. Magnitude das variações na dinâmica do MNG para as energias, *sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J, em **(A)**: MNG do IST do músculo vasto lateral (\dot{Q}), **(B)**: MNG da deoxihemoglobina do músculo vasto lateral, **(C)**: MNG do IST do músculo tríceps sural e **(D)**: MNG da deoxihemoglobina do músculo tríceps sural.

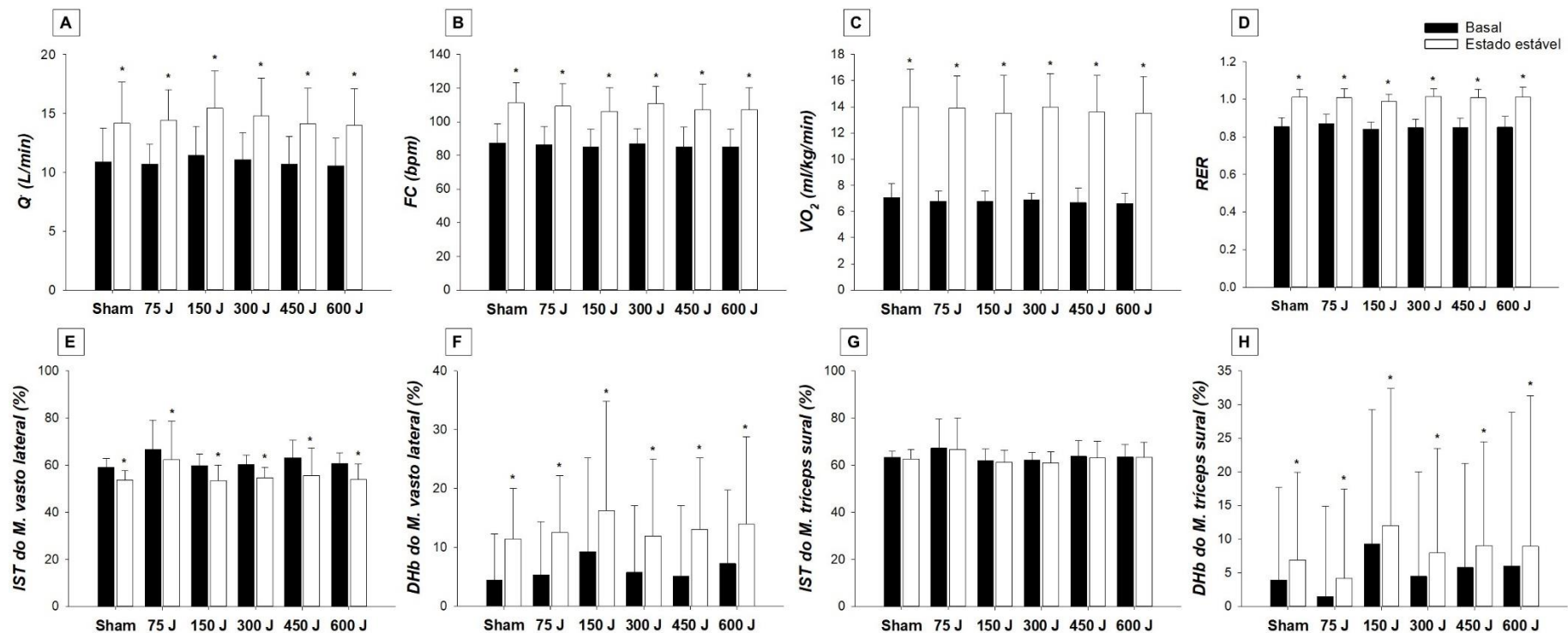


Figura 10. Diferença entre os momentos basal e estado estável para as energias *sham*, 75, 150, 300, 450 e 600 J, em **(A)**: débito cardíaco (\dot{Q}) e **(B)**: frequência cardíaca **(C)**: consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$), **(D)**: razão de troca respiratória (RER), **(E)**: índice de saturação tecidual do músculo vasto lateral, **(F)**: deoxihemoglobina do músculo vasto lateral, **(G)**: índice de saturação tecidual do músculo tríceps sural e **(H)**: deoxihemoglobina do músculo tríceps sural. *: $p < 0,05$ quando comparado ao momento basal.

6.4 DISCUSSÃO

Até o presente, este foi o primeiro estudo a investigar os efeitos agudos da TFBM associado a um protocolo de carga constante seguido por protocolo pseudorrandômico binário na dinâmica cardiorrespiratória e deoxigenação muscular, em indivíduos com DM2. Contrariando nossa hipótese inicial, verificamos que a TFBM, independentemente da energia irradiada, não modificou as respostas hemodinâmicas e ajustes cardiorrespiratórios, exceto a dinâmica (MNG) do \dot{Q} com a energia de 600 J.

Nossa premissa foi fundamentada no fato da TFBM estimular a microcirculação, melhorando a perfusão para os tecidos alvos, incluindo o músculo esquelético. (30) Ainda, sob o ponto de vista celular, estudos anteriores indicam que a TFBM pode influenciar o metabolismo mitocondrial, melhorando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) e, conseqüentemente, aumentando a disponibilidade de energia para as fibras musculares.(7,11,13,31) Tais condições, por conseguinte, poderiam melhorar as respostas fisiológicas do sistema aeróbio durante e imediatamente após o exercício físico.

Em estudo prévio (7), os autores avaliaram os efeitos agudos da irradiação de 150 J da TFBM por meio de LEDs durante a transição do repouso para o exercício físico moderado, de curta duração (15 minutos) e verificaram que a combinação das terapias reduziram agudamente os níveis de glicemia em indivíduos com DM2, sem modificar a dinâmica cardiorrespiratória e hemodinâmica. Tal evidência corrobora nossos achados no que diz respeito a dinâmica do $\dot{V}O_2$, e a resposta de variáveis hemodinâmicas, exceto o DC, mesmo realizando um protocolo de exercício moderado, PCC + PRBS, de maior duração (26 minutos).

Ainda corroborando nossos resultados, Beltrame *et al.* (13) investigaram as respostas após 30 minutos e 6 horas da TFBM (200 LEDs, vermelho e infravermelho, com comprimento de onda de 830 e 630 nm e 180 J de energia), seguido por PRBS, e os resultados mostraram que não houve influência na dinâmica do $\dot{V}O_2$. Entretanto, os efeitos encontrados por estudos realizados em população saudável mostraram que a TFBM administrada antes do exercício (resistido ou aeróbio) promoveu efeitos ergogênicos no tecido muscular, promovendo melhora da performance, com aumento no número de repetições e

redução das concentrações de lactato.(32–34) Vale destacar que nosso desenho experimental difere dos estudos conduzidos até o momento em relação aos tipos de dispositivos e parâmetros como, energia, tempo de aplicação e locais irradiados.

No que diz respeito a dinâmica do $\dot{V}O_2$ na transição do repouso para o exercício, sabemos que a mesma é utilizada como forma de investigar os ajustes da resposta aeróbia no suprimento de uma nova demanda energética. (35) O aumento do $\dot{V}O_2$ no início do exercício parece ser determinado pelo controle integrativo de diversos mecanismos que envolvem o transporte de oxigênio (O_2) por meio da circulação, e do seu consumo pelo miócito. (35)

Como observado, as condições expostas previamente à TFBM não diferiram da condição *sham*, considerando o comportamento da dinâmica do $\dot{V}O_2$. Por esse motivo, é provável que os efeitos sejam atribuídos apenas ao protocolo de exercício físico, sem interferência da TFBM quando aplicada em diferentes energias.

Além disso, nessa mesma linha de raciocínio, a medição da *DHb* conjuntamente com $\dot{V}O_2$ durante o exercício pode fornecer inferências úteis sobre o fluxo sanguíneo regional e permitir estimar o aumento do fluxo sanguíneo microvascular. (36) Com base no princípio de Fick, durante o repouso, sabemos que o consumo de oxigênio é constante, e a TFBM proporciona uma maior utilização de O_2 e, conseqüentemente, pode acarretar o aumento da extração de oxigênio da microcirculação.(37–40) Por outro lado, uma maior oferta de O_2 causada pela vasodilatação promovida pela TFBM pode diminuir a extração de oxigênio da circulação local. (37–40) No nosso estudo, não observamos diferenças entre as respostas na saturação tecidual de O_2 quando comparadas as condições efetivas e *sham* da TFBM. Por isso, diante do protocolo de tratamento proposto, parece-nos que a TFBM não potencializou mudanças na oxigenação muscular periférica durante o exercício.

Mesmo com tais achados, e antes de qualquer conclusão a respeito da TFBM como recurso ergogênico prévio ao exercício físico, devemos considerar alguns aspectos possivelmente influenciadores das respostas fisiológicas: (1) diferenças dos parâmetros utilizados para a TFBM, como tipo de luz, comprimento de onda, energia; (2) tempo e regiões corporais selecionadas para

a aplicação da terapia; e (3) características específicas da população estudada, sobretudo com a possibilidade de alterações vasculares subclínicas, incluindo a disfunção microvascular ocasionada pela DM2.(30,41)

Nosso estudo mostra algumas limitações. São elas: (1) amostra pequena, (2) protocolo único de exercício, o que não garante que o efeito observado possa ser o mesmo quando associado a outras modalidades de exercício (resistido, por exemplo); (3) a intensidade do protocolo de exercício aplicado; (4) a falta de homogeneidade em relação ao tempo desde o diagnóstico da DM2, o que pode ter mascarado eventuais adaptações fisiopatológicas negativas e relacionadas ao curso natural da doença.

6.5 CONCLUSÃO

Nossos achados mostraram que a TFBM, aplicada de forma aguda em diferentes energias, considerando o n estudado, não promoveu melhora na dinâmica do $\dot{V}O_2$ e de variáveis hemodinâmicas, exceto para o DC. Apesar dos achados, sugerimos que estudos futuros investiguem a associação da TFBM com outras intensidades e modalidades de exercício físico, além de diferentes energias, buscando-se a melhor recomendação para sua utilização no tratamento do DM2.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (bolsa 2013 / 07953-3 e 2017 / 09639-5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (bolsa 311938 / 2013-2 e 425360/2018 -0), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Bolsa de Pesquisa AUXPE 1766732 / 2018–2021). Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

Informação adicional

Interesses competitivos

Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beltrame T, Hughson RL. Mean Normalized Gain: A New Method for the Assessment of the Aerobic System Temporal Dynamics during Randomly Varying Exercise in Humans. *Front Physiol.* 2017;8:504.
2. Francisco C de O, Beltrame T, Ferraresi C, Parizotto NA, Bagnato VS, Borghi Silva A, et al. Evaluation of acute effect of light-emitting diode (LED) phototherapy on muscle deoxygenation and pulmonary oxygen uptake kinetics in patients with diabetes mellitus: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015 Dec;16:572.
3. Beltrame T, Hughson RL. Aerobic system analysis based on oxygen uptake and hip acceleration during random over-ground walking activities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2017 Jan;312(1):R93–100.
4. Koschate J, Drescher U, Brinkmann C, Baum K, Schiffer T, Latsch J, et al. Faster heart rate and muscular oxygen uptake kinetics in type 2 diabetes patients following endurance training. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab.* 2016 Nov;41(11):1146–54.
5. Koschate J, Drescher U, Baum K, Brinkmann C, Schiffer T, Latsch J, et al. Heart Rate and Oxygen Uptake Kinetics in Type 2 Diabetes Patients - A Pilot Study on the Influence of Cardiovascular Medication on Regulatory Processes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2017 May;125(5):275–81.
6. Rocha J, Gildea N, O'Shea D, Green S, Egaña M. Influence of priming exercise on oxygen uptake and muscle deoxygenation kinetics during moderate-intensity cycling in type 2 diabetes. *J Appl Physiol.* 2019 Oct;127(4):1140–9.
7. Francisco C de O, Beltrame T, Hughson RL, Milan-Mattos JC, Ferroli-Fabricio AM, Galvão Benze B, et al. Effects of light-emitting diode therapy (LEDT) on cardiopulmonary and hemodynamic adjustments during aerobic exercise and glucose levels in patients with diabetes mellitus: A randomized, crossover, double-blind and placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med.* 2019 Feb;42:178–83.
8. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top quantum Electron a Publ IEEE Lasers Electro-optics Soc.* 2016;22(3).
9. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang Y-Y, de Sousa MVP, Bagnato VS, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol.* 2015;91(2):411–6.
10. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med [Internet].* 2012 Nov 1;1(4):267–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23626925>
11. de Brito Vieira WH, Ferraresi C, Schwantes MLB, de Andrade Perez SE,

- Baldissera V, Cerqueira MS, et al. Photobiomodulation increases mitochondrial citrate synthase activity in rats submitted to aerobic training. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2018;33(4):803–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2424-2>
12. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD, Costa LOP, Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2018 Jan;33(1):181–214.
 13. Beltrame T, Ferraresi C, Parizotto NA, Bagnato VS, Hughson RL. Light-emitting diode therapy (photobiomodulation) effects on oxygen uptake and cardiac output dynamics during moderate exercise transitions: a randomized, crossover, double-blind, and placebo-controlled study. *Lasers Med Sci*. 2018 Jul;33(5):1065–71.
 14. de Oliveira AR, Vanin AA, Tomazoni SS, Miranda EF, Albuquerque-Pontes GM, De Marchi T, et al. Pre-Exercise Infrared Photobiomodulation Therapy (810 nm) in Skeletal Muscle Performance and Postexercise Recovery in Humans: What Is the Optimal Power Output? *Photomed Laser Surg*. 2017 Nov;35(11):595–603.
 15. Beltrame T, Hughson RL. Linear and non-linear contributions to oxygen transport and utilization during moderate random exercise in humans. *Exp Physiol* [Internet]. 2017;102(5):563–77. Available from: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/EP086145>
 16. Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ*. 2010 Mar;340:c869.
 17. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2014;37(Supplement 1):S81--S90. Available from: https://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S81
 18. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005 Apr;28(4):956–62.
 19. Committee on Exercise - American Heart Association. Exercise testing and training of apparently healthy individuals: a handbook for physicians. 1972. p. 40.
 20. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jul;45(1):18–31.
 21. Homma S, Fukunaga T, Kagaya A. Influence of adipose tissue thickness on near infrared spectroscopic signal in the measurement of human muscle. *J Biomed Opt*. 1996 Oct;1(4):418–24.
 22. Balady GJ, Arena R, Sietsema K, Myers J, Coke L, Fletcher GF, et al. Clinician's Guide to cardiopulmonary exercise testing in adults: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010

- Jul;122(2):191–225.
23. Dafoe W. Principles of Exercise Testing and Interpretation. *Can J Cardiol* [Internet]. 2007 Mar 15;23(4):274. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647882/>
 24. Beaver WL, Wasserman K, Whipp BJ. A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. *J Appl Physiol*. 1986 Jun;60(6):2020–7.
 25. Castello-Simões V, Minatel V, Karsten M, Simões RP, Perseguini NM, Milan JC, et al. Circulatory and Ventilatory Power: Characterization in Patients with Coronary Artery Disease. *Arq Bras Cardiol*. 2015 Jun;104(6):476–85.
 26. Milan-Mattos JC, de Oliveira Francisco C, Ferroli-Fabício AM, Minatel V, Marcondes ACA, Porta A, et al. Acute effect of photobiomodulation using light-emitting diodes (LEDs) on baroreflex sensitivity during and after constant loading exercise in patients with type 2 diabetes mellitus. *Lasers Med Sci*. 2020 Mar;35(2):329–36.
 27. Dyson KS, Shoemaker JK, Arbeille P, Hughson RL. Modelflow estimates of cardiac output compared with Doppler ultrasound during acute changes in vascular resistance in women. *Exp Physiol*. 2010 Apr;95(4):561–8.
 28. Keir DA, Nederveen JP, Paterson DH, Kowalchuk JM. Pulmonary O₂ uptake kinetics during moderate-intensity exercise transitions initiated from low versus elevated metabolic rates: insights from manipulations in cadence. *Eur J Appl Physiol*. 2014 Dec;114(12):2655–65.
 29. Hughson RL, Winter DA, Patla AE, Swanson GD, Cuervo LA. Investigation of VO₂ kinetics in humans with pseudorandom binary sequence work rate change. *J Appl Physiol*. 1990 Feb;68(2):796–801.
 30. Gavish L, Hoffer O, Rabin N, Halak M, Shkilevich S, Shayovitz Y, et al. Microcirculatory Response to Photobiomodulation-Why Some Respond and Others Do Not: A Randomized Controlled Study. Vol. 52, *Lasers in surgery and medicine*. United States; 2020. p. 863–72.
 31. da Silva Alves MA, Pinfildi CE, Neto LN, Lourenço RP, de Azevedo PHSM, Dourado VZ. Acute effects of low-level laser therapy on physiologic and electromyographic responses to the cardiopulmonary exercise testing in healthy untrained adults. *Lasers Med Sci*. 2014 Nov;29(6):1945–51.
 32. Leal-Junior ECP, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho P de TC, Dal Corso S, Bjordal JM. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2015 Feb;30(2):925–39.
 33. Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy in skeletal muscle: from exercise performance to muscular dystrophies. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2015/02/05. 2015 Feb;33(2):53–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25654277>

34. Rossato M, Dellagrana R, Sakugawa R, Baroni B, Diefenthaeler F. Dose-response effect of photobiomodulation therapy on muscle performance and fatigue during a multiple-set knee extension exercise: A randomized, crossover, double-blind, placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg.* 2020 Apr 30;
35. Beltrame T, Villar R, Hughson RL. Sex differences in the oxygen delivery, extraction, and uptake during moderate-walking exercise transition. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab.* 2017 Sep;42(9):994–1000.
36. Bauer T, Reusch J, Levi M, Regensteiner J. Skeletal Muscle Deoxygenation After the Onset of Moderate Exercise Suggests Slowed Microvascular Blood Flow Kinetics in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30:2880–5.
37. Linares SN, Beltrame T, Ferraresi C, Galdino GAM, Catai AM. Photobiomodulation effect on local hemoglobin concentration assessed by near-infrared spectroscopy in humans. *Lasers Med Sci.* 2020 Apr;35(3):641–9.
38. Ferreira LF, Townsend DK, Lutjemeier BJ, Barstow TJ. Muscle capillary blood flow kinetics estimated from pulmonary O₂ uptake and near-infrared spectroscopy. *J Appl Physiol.* 2005 May;98(5):1820–8.
39. Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med.* 2000;27(5):427–37.
40. Ihsan FRM. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg.* 2005 Jun;23(3):289–94.
41. Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomed Laser Surg.* 2004 Aug;22(4):323–9.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E DESDOBRAMENTOS FUTUROS

De acordo com os estudos que compõem a tese, podemos observar que a TFBM quando aplicada em jovens saudáveis é capaz de melhorar a oxigenação tecidual. Posto isso, nos questionamos se a TFBM potencializaria as respostas fisiológicas na população diabética e observamos que quando aplicada isolada, e em energias específicas, foi capaz de proporcionar diminuição dos níveis de glicemia, lactato, FC e RVP e, aumento do \dot{Q} . Entretanto, quando aplicada previamente a protocolo de exercício de moderada intensidade e maior duração (26 minutos), composto por protocolo de carga constante e protocolo pseudorrandômico binário, não foi capaz de promover efeitos distintos da aplicação *sham* nos ajustes cardiorrespiratórios e nas variáveis hemodinâmicas, exceto no DC.

Dessa forma, considerando tais resultados, acreditamos que há necessidade de novos estudos pois ainda permanecem lacunas de conhecimento sobre a TFBM e que devem ser objeto de novas investigações e questionamentos. Por exemplo: (1) Em indivíduos com DM2, há alguma característica específica ou fenótipo determinante que indique os potenciais respondedores à TFBM? (2) Mesmo que nosso estudo não tenha mostrado resposta aguda da TFBM associada ao exercício de intensidade moderada nos ajustes cardiorrespiratórios e na maioria das variáveis hemodinâmicas, é possível que haja algum tipo de adaptação ou efeito crônico a partir desse mesmo protocolo terapêutico de terapia por fotobiomodulação?

Como desdobramentos futuros, ressaltamos que ainda realizaremos processamento de dados e análises de outras variáveis obtidas por meio das variáveis metabólicas, hemodinâmicas e ergoespirométricas que não foram possíveis de apresentar nessa tese.

APÊNDICE A – Termo de consentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia
Via Washington Luís, Km 235 Caixa Postal 676
13565-905 – São Carlos – SP – Brasil
Tel: (016)3351-8448 / Fax: (016)3361-2081
e-mail: ppgft@ufscar.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO DE PARTICIPAÇÃO
NO PROJETO DE PESQUISA:

**“INFLUÊNCIA DA FOTOTERAPIA NAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS
CENTRAIS E PERIFÉRICAS NO DIABETES *MELLITUS*”**

RESPONSÁVEIS PELO PROJETO

Orientadora: Prof^a. Dra. Aparecida Maria Catai.

Discente: Stephanie Nogueira Linares

LOCAL DO DESENVOLVIMENTO DO PROJETO: Núcleo de Pesquisa em
Exercício Físico (NUPEF) - Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular do
Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Eu, _____, _____ anos de idade, portador
do RG n°. _____, residente à Rua (Av):

_____, n.

_____, Bairro: _____, Cidade de:

_____, Estado: _____, fui convidado a participar

voluntariamente do projeto de pesquisa “Influência da fototerapia nas respostas
fisiológicas centrais e periféricas no Diabetes *Mellitus*”.

A pesquisa tem por finalidade avaliar e correlacionar a influência do diabetes
sobre a capacidade cardiorrespiratória e a inflamação.

A coleta de dados será composta por 9 visitas no total, sendo as 3
primeiras visitas destinadas à coleta de informações para a sua identificação,
além de alguns dados clínicos e físicos. Posteriormente, para as próximas 6
visitas, com intervalo de 15 dias, será realizado teste de carga incremental com
aplicação de fototerapia por diodos emissores de luz para verificar se esse
equipamento ajuda na melhora da capacidade cardiorrespiratória e coleta de
sangue no lóbulo da orelha antes e depois do exercício de carga incremental
para verificar se o exercício modifica as concentrações de lactato e glicose no
sangue.

Antes de iniciar os testes, você receberá várias instruções e será acompanhado por uma equipe treinada que estará alerta a qualquer alteração que possa sugerir a interrupção da avaliação.

Os benefícios que podem advir com a participação na pesquisa são os voluntários conhecerem detalhadamente seu estado de saúde no que se refere à função cardiorrespiratória. Essa pesquisa proporcionará dados de relevância clínica sobre o potencial terapêutico de Diodos Emissores de Luz no Diabetes Mellitus. Os riscos que podem ocorrer com a participação são desconforto e hematoma durante e após a retirada do sangue no lóbulo da orelha, cansaço físico, falta de ar, desconforto muscular e boca seca durante a avaliação. Em qualquer situação de desconforto para o voluntário, a equipe de profissionais presentes estará pronta para auxiliar, e a avaliação será interrompida até que o voluntário esteja apto a prosseguir com os testes.

Você tem a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos e benefícios e de outras situações relacionadas à pesquisa. Além disso, os pesquisadores responsáveis se comprometem a fornecer todos os resultados de suas avaliações, de exames de sangue e informações atualizadas sobre o estudo.

Você poderá desistir de participar desta pesquisa, a qualquer momento e se isso acontecer, não haverá nenhum prejuízo.

As consultas serão gratuitas e não haverá compensação em dinheiro pela sua participação. Todas as informações a seu respeito serão mantidas em segredo. Para isso, na ficha de exame clínico não aparecerá nenhum nome que o identifique, apenas um número que somente o pesquisador principal saberá a quem se refere. Os dados coletados poderão ser divulgados em eventos, revistas e/ou trabalhos científicos, sempre preservando a sua identidade.

Todas as despesas com o transporte e a alimentação decorrentes da sua participação na pesquisa, quando for o caso, serão ressarcidas em dinheiro no dia da coleta. Você terá direito a indenização por qualquer tipo de dano resultante da sua participação na pesquisa.

O presente termo será emitido em duas vias, sendo que uma delas ficará em posse dos pesquisadores e outra será entregue para você, assim poderá se

comunicar com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa, a qualquer momento, nos telefones abaixo.

Este projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, cujo endereço e telefone estão apresentados neste termo, e seguirá as atribuições definidas na Resolução 466/2012 do CNS.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-reitora de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@ufscar.br

Endereço para contato (24 horas por dia e sete dias por semana):

Pesquisadores Responsáveis: Stephanie Nogueira Linares e Prof^a. Dra Aparecida Maria Catai

Endereço: LABORATÓRIO DE FISIOTERAPIA CARDIOVASCULAR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (NUPEF) – Departamento de Fisioterapia: Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil.

Contato telefônico: (16) 3351-8705 / (17) 98132-9090

E-mail: ste_linares@hotmail.com e/ou amcatai@gmail.com

Local e data: _____

Stephanie Nogueira Linares

Assinatura do Pesquisador

Nome do Participante

Assinatura do Participante

São Carlos, _____ de _____ de _____.

ANEXO A – Estudo 1



Photobiomodulation effect on local hemoglobin concentration assessed by near-infrared spectroscopy in humans

Stephanie Nogueira Linares¹ · Thomas Beltrame^{1,2} · Cleber Ferreira³ · Gabriela Aguiar Mesquita Galdino¹ · Aparecida Maria Catal¹

Received: 25 February 2019 / Accepted: 9 August 2019
© Springer-Verlag London Ltd, part of Springer Nature 2019

Abstract

Exposure of biological tissue to photobiomodulation therapy (PBMT) seems to increase the oxygen availability and mitochondrial electrochemical activity. With the advancement of new technologies, such as near-infrared spectroscopy (NIRS), information can be obtained about the balance between oxygen utilization and delivery by assessing local oxy- ($[O_2Hb]$) and deoxy-hemoglobin ($[HHb]$) concentrations, both measured in micromolar (μM). Consequently, NIRS can be used to study (“in vivo”) PBMT effects on the oxidative system, including oxygen availability. Thus, the main objective of the present study was to use NIRS to investigate the acute effects of PBMT by light-emitting diode (LED) on the oxygen delivery and utilization in humans. Twelve healthy young participants were treated with a LED device (830 nm, 50 mW, 2 J) and placebo applied over the proximal third of the *flexor carpi ulnaris* muscle of the left or right forearm selected in a random order. The LED was applied in direct contact with skin and the device was switched on for 40 s in 4 different interventions (I_1 , I_2 , I_3 and I_4) with a 3-min interval between interventions. The placebo condition was considered as the period before the first PBMT. The NIRS device was used to evaluate the relative changes in $[O_2Hb]$ and $[HHb]$ before and after placebo and interventions. We found that PBMT statistically increased the $[O_2Hb]$ in 0.39 μM . These results demonstrate the potential of PBMT to increase oxygen availability.

Keywords Photobiomodulation · Low-level laser therapy · Mitochondria · NIRS · Cytochrome c

Introduction

Based on the oxidation of high-energy compounds, mitochondria play a key role in cellular function and maintenance of cellular homeostasis through adenosine triphosphate (ATP) re-synthesis [1]. Exposure of biological tissues that contain

mitochondria to therapeutic lights, or photobiomodulation therapy (PBMT), can stimulate mitochondrial function by increasing its electrochemical activity, resulting in a higher ATP re-synthesis rate [2–5]. The main mechanism of photobiomodulation (PBM) action to stimulate mitochondria and ATP re-synthesis is related to the increased cytochrome c oxidase (Cox, terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain) activity [6–8]. The greater oxidation capacity of Cox, promoted by PBM, should lead to changes in intracellular oxygen consumption and energy production through mitochondrial oxidative phosphorylation [6]. Therefore, modifications in the oxidative capacity of Cox would result in alterations in the oxygen delivery-utilization balance [9, 10].

In addition to its effects on Cox, the PBM also seems to contribute to better blood microcirculation [11–13]. This increase in oxygen delivery may influence the skeletal muscle capacity to perform exercises through several proposed mechanisms of action [1, 8, 14]. Moreover, studies suggest that PBMT is of great importance to restore the functional capacity of a diseased population by increasing the local oxygen delivery [15, 16].

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10103-019-02861-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Thomas Beltrame
beltramethomas@gmail.com

¹ Cardiovascular Physical Therapy Laboratory, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil

² Institute of Computing, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

³ Biomedical Engineering Postgraduate Program, Universidade Estadual, São Paulo, Brazil

***ANEXO B – Comprovante de submissão
Estudo 2***

10/02/2021

Gmail - Your manuscript submission - 656309



Stephanie Linares <stenolinares@gmail.com>

Your manuscript submission - 656309

Frontiers Physiology <physiology.editorial.office@frontiersin.org>

20 de janeiro de 2021 10:01 Responder a: Frontiers Physiology
<physiology.editorial.office@frontiersin.org>

Para: Stephanie Linares <stenolinares@gmail.com> Dear Dr Linares

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Energy-dependent effect of photobiomodulation

therapy on hemodynamic and metabolic responses in adults with type 2 Diabetes Mellitus: a randomized, crossover, double-blind, sham-controlled trial" to be considered for publication in Frontiers in Physiology, section Vascular Physiology.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate.

Best regards,

Your Frontiers in Physiology Team

Frontiers | Editorial Office -
Collaborative Peer Review
Team www.frontiersin.org

[Avenue du Tribunal Fédéral](#)
34, 1005 Lausanne,
Switzerland Office T 41 21
510 17 40

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org)
or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Energy-dependent effect of photobiomodulation therapy on hemodynamic and metabolic responses in adults with type 2 Diabetes Mellitus: a randomized, crossover, double-blind, sham-controlled trial

Manuscript ID: 656309

Authors: Stephanie Nogueira Linares, Thomas Beltrame, Gabriela Aguiar Mesquita Galdino, Maria Cecilia = de Moraes Frade, Juliana Cristina Milan-Mattos, Mariana De Oliveira Gois, Audrey Borghi-Silva, Priscila Faleiro de Biase, Fúlvia Barros Manchado-Gobatto, Vanderlei Salvador Bagnato, Nivaldo Antonio Parizotto, Cleber Ferraresi and Aparecida Maria Catai

Journal: Frontiers in
Physiology, section Vascular
Physiology Article type:
Original Research

Submitted on: 20 Jan 2021

Research Topic: Metabolic Regulation of Cardiac and Vascular Cell Function:
Physiological and Pathophysiological Implications

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=1141&name=vascular_physiology

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: https://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=608d6b1e19&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1689410824253829338&simpl=msg-f%3A16894108242...> 1/1

ANEXO C – Cômite de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO NAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS CENTRAIS E PERIFÉRICAS NO DIABETES MELLITUS

Pesquisador: Aparecida Maria Catal

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 80989017.6.0000.5504

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.592.693

Apresentação do Projeto:

Introdução : Pesquisas relacionadas à promoção da saúde tem se mostrado crescente nos últimos anos, principalmente devido ao aumento no número de pessoas acometidas por Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT). Dentre as DCNT mais encontradas, destaca-se o Diabetes Mellitus (DM), o qual é conhecido como uma desordem metabólica associada a diversas complicações musculoesqueléticas e cardiopulmonares.

Evidências recentes demonstraram resultados benéficos na aplicação da fototerapia para a melhora cardiopulmonar, tanto na aplicação antes, quanto após o exercício. Assim, torna-se relevante a investigação do efeito da fototerapia , explorando os efeitos observados na aplicação antes e após o exercício. **Objetivo:** Estabelecer curva-dose resposta após aplicação de fototerapia por meio de diodos emissores de luz (LEDs). **Métodos:** O estudo será composto por participantes com diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo II, do sexo masculino, alocados a partir de uma randomização estratificada em 5 grupos: Grupo Experimental Placebo (GP), Grupo Experimental 75J (G75), Grupo Experimental 150J (G150), Grupo Experimental

300J (G300), Grupo Experimental 450J (G450). A aplicação da fototerapia e placebo será administrada antes da realização do teste ergométrico incremental. Os dados serão expressos em média e desvio padrão. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene serão utilizados para verificar a distribuição dos dados (Gauss e variância), respectivamente. Para a análise estatística dos resultados será realizada por duas vias de medidas repetidas, ANOVA e Post Hoc com o teste de

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)3361-9883

E-mail: cep@ufscar.br



Continuação do Projeto: 2.592.690

Tukey para Intergrupo, Intragrupo e múltipla comparação. O nível de significância será fixado em 5% ($p < 0,05$) e o poder estatístico será fixado em 0,08, o qual corresponde ao valor mínimo recomendado na literatura para minimizar o erro tipo II.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo primário do presente estudo é caracterizar a resposta do tecido muscular após irradiação da fotobiomodulação com diodos emissores de luz (LED) de baixa intensidade utilizando protocolos experimentais com diferentes energias.

Objetivo Secundário:

Os objetivos secundários são: Determinar a curva dose-resposta; Avaliar a influência dessas radiações sobre os níveis glicêmicos e de Oxigenação e Deoxigenação muscular (NIRS); Verificar as possíveis alterações no perfil lipídico dos participantes que possa ser proporcionado após aplicação da fototerapia; Verificar associações entre as respostas inflamatórias e Verificar possíveis alterações na função endotelial após aplicação da fototerapia e teste de carga incremental.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos que pode haver com a participação são desconforto e hematoma durante e após a retirada do sangue no lóbulo da orelha, cansaço físico, falta de ar, desconforto muscular e boca seca durante a avaliação. Em qualquer situação de desconforto para o voluntário, a equipe de profissionais presentes estará pronta para auxiliar, e a avaliação será interrompida até que o voluntário esteja apto a prosseguir com os testes.

Benefícios:

Os benefícios que podem advir com a participação na pesquisa são os voluntários conhecerem detalhadamente seu estado de saúde no que se refere à função cardiopulmonar. Além disso, os resultados podem contribuir para o melhor controle do Diabetes na sua vida, para orientar sobre a realização de exercício físico a ser realizada e que auxiliará na melhora da sua qualidade de vida.

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)3351-0833

E-mail: ceptumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer 2.582.693

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi modificado em linguagem mais acessível, no entanto, o pesquisador precisa escrever também em linguagem simples o que é terapia de fotobiomodulação.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado condicionado a explicar no TCLE o que é terapia de fotobiomodulação de forma a deixar a linguagem mais acessível ao participante.

Considerações Finais e horário do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_919779.pdf	28/03/2018 14:54:16		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_doutorado.pdf	28/03/2018 14:53:00	Aparecida Maria Catal	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	12/03/2018 17:08:37	Aparecida Maria Catal	Aceito
Outros	USE.pdf	10/01/2018 15:51:56	Aparecida Maria Catal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	10/01/2018 15:50:13	Aparecida Maria Catal	Aceito
Folha de Rosto	COMITE.pdf	21/11/2017 12:06:47	Aparecida Maria Catal	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)3351-0600

E-mail: cephumanos@ufscar.br



UFSCAR - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS



Continuação do Parecer: 2.562.060

SAO CARLOS, 11 de Abril de 2018

Assinado por:
Priscilla Hortense
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.505-005

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3261-0603

E-mail: cephumanos@ufscar.br

Página 04 de 04

ANEXO D – Registro no ReBEC

Approved Submission - RBR-8r23ds

registrorebec@gmail.com <registrorebec@gmail.com>

Qua, 06/02/2019 12:38

Para: ste_linares@hotmail.com <ste_linares@hotmail.com>; rebec@icict.fiocruz.br <rebec@icict.fiocruz.br>; dtostes@gmail.com <dtostes@gmail.com>

Url do registro(trial url):<http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-8r23ds/>
Numero de Registro (Register Number):RBR-8r23ds

Prezado Registrante,

Temos o prazer de informar que seu estudo foi publicado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC).

Agradecemos por seu registro e colaboração e, desde já, nos colocamos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que possam surgir, seja em caso de atualização do registro ou, até mesmo, uma nova submissão.

Por favor, não hesite em contactar-nos. Cordialmente,

ReBEC Staff - ReBEC/ICICT/LIS Av. Brasil 4036 - Maré - sala 807

Rio de Janeiro RJ CEP: 21040-360 Tel: +55(21)3882-9227

www.ensaiosclinicos.gov.br

Approved Submission - RBR-6vgmtb

registrorebec@gmail.com <registrorebec@gmail.com>

Seg, 08/10/2018 14:05

Para: ste_linares@hotmail.com <ste_linares@hotmail.com>; rebec@icict.fiocruz.br <rebec@icict.fiocruz.br>; dtostes@gmail.com <dtostes@gmail.com>

Url do registro(trial url):<http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-6vgmtb/> Numero de Registro (Register Number):RBR-6vgmtb

Prezado Registrante,

Temos o prazer de informar que seu estudo foi publicado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC).

Agradecemos por seu registro e colaboração e, desde já, nos colocamos à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que possam surgir, seja em caso de atualização do registro ou, até mesmo, uma nova submissão.

Por favor, não hesite em

contactar-nos. Cordialmente,

ReBEC Staff - ReBEC/ICICT/LIS Av. Brasil 4036 - Maré - sala 807

Rio de Janeiro RJ CEP: 21040-360 Tel: +55(21)3882-9227

www.ensaiosclinicos.gov.br
