



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**USO DAS TERAPIAS LASER E LED (*LIGHT-EMITTING DIODE*)
DE BAIXA INTENSIDADE PARA AUMENTAR O DESEMPENHO
MUSCULAR: DO *IN VITRO* E EXPERIMENTAL AO USO CLÍNICO**

CLEBER FERRARESI

SÃO CARLOS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**USO DAS TERAPIAS LASER E LED (*LIGHT-EMITTING DIODE*)
DE BAIXA INTENSIDADE PARA AUMENTAR O DESEMPENHO
MUSCULAR: DO *IN VITRO* E EXPERIMENTAL AO USO CLÍNICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia

DISCENTE

Cleber Ferraresi

ORIENTADORES

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto
Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

SUPERVISORES DOS ESTÁGIOS NO EXTERIOR

Prof. Dr. Michael R. Hamblin
Massachusetts General Hospital – Harvard Medical School

Prof. Dr. Richard L. Hughson
Faculdade de Ciências Aplicadas da Saúde – University of Waterloo

SÃO CARLOS
2014

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

F374tL Ferraresi, Cleber.
 Uso das terapias laser e LED (*Light-emitting diode*) de
baixa intensidade para aumentar o desempenho muscular :
do *in vitro* e experimental ao uso clínico / Cleber Ferraresi. --
São Carlos : UFSCar, 2015.
 342 f.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.

 1. Biotecnologia. 2. Laser de baixa intensidade. 3. LED. 4.
Fadiga muscular. 5. Expressão gênica. 6. Esportes. I. Título.

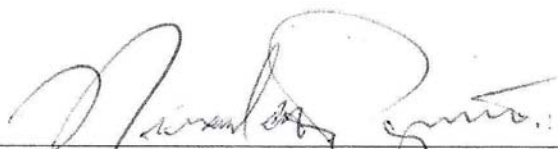
CDD: 660.6 (20^a)

Cleber Ferraresi

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 08/12/2014

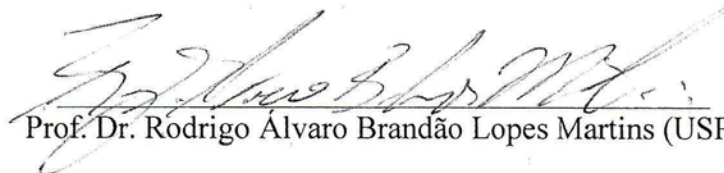
BANCA EXAMINADORA



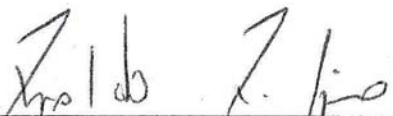
Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto (orientador)



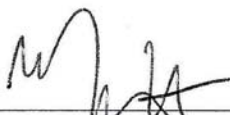
Prof. Dr. Wouber Héricson de Brito Vieira (UFRN)



Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins (USP)



Prof. Dr. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro (USP)



Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr. (UFSCar)

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP:

1- Bolsa de Doutorado regular no país: processo 2010/07194-7;

2- Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE: processo 2012/05919-0.

Dedico esta tese...

...A Deus por todas as bênçãos concedidas em minha vida e ao meu Anjo da

Guarda que sempre está comigo.

...À minha família por ser a base e meu porto seguro! Sem o incentivo e amor

incondicional de vocês nada seria possível.

Agradeço especialmente aos meus pais, Lourenço e Ângela, por serem os meus

heróis e exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

Durante a realização da tese passei por muitos desafios, mas sempre estive cercado de pessoas muito sábias e competentes que contribuíram e me orientaram para a consecução desse trabalho. Sou muito grato a todos aqueles que tornaram possível eu alcançar mais essa etapa de minha vida. Nesse processo, pude compreender que as trocas de experiências entre as pessoas elevam a nossa existência, e isso faz mais sentido quando nos cercamos de pessoas que almejam o bem. Mesmo que em poucas palavras, gostaria de demonstrar o meu reconhecimento a todos que estiveram ao meu lado nessa caminhada:

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec)** da **Universidade Federal de São Carlos - UFSCar** e também ao Programa de **Pós-Graduação em Fisioterapia (PPG-FT)** da UFSCar, incluindo todo o corpo docente e administrativo. Sou muito grato também ao **Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica (CEPOF)** do **Instituto de Física de São Carlos – IFSC** da **Universidade de São Paulo – USP**, incluindo todo o corpo administrativo, cientistas e alunos.

Agradeço especialmente aos meus orientadores:

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto por ser um “pai científico” durante toda a minha pós-graduação. Obrigado pelas orientações acadêmicas, ensinamentos e conselhos para a vida ao longo de toda a nossa convivência. Obrigado por todas as oportunidades e por me acolher como um filho em diversos momentos.

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato por ser um exemplo de liderança e sabedoria. Durante a nossa convivência aprendi a admirá-lo e tê-lo como uma de minhas referências de empenho, força de vontade, organização e muito trabalho. Obrigado por todas as oportunidades e o constante compartilhamento do conhecimento e ideias inovadoras.

Ao **Prof. Dr. Michael R. Hamblin** do Massachusetts General Hospital – Harvard Medical School, por me receber em seu laboratório de forma muito generosa e acolhedora. Suas orientações foram muito valiosas para o meu aprendizado. Agradeço também à sua equipe de trabalho, em especial à **Andrea Brissette, YingYing Huang e Daniela Vecchio** pela amizade, ajuda com as pesquisas e também orientações durante o meu estágio.

Ao **Prof. Dr. Richard L. Hughson** da University of Waterloo que foi extremamente generoso e simpático ao me receber em seu laboratório. Apesar do pequeno tempo de convivência, tive ótimas orientações. O seu grupo de pesquisa também foi muito acolhedor e prestativo, especialmente os amigos Thomas Beltrame, Cleyton Vargas, Kylie e Danielle Greaves que me auxiliaram em todas as horas.

Aos Membros da Banca Examinadora, **Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, Prof. Dr. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro, Prof. Dr. Wouber Héricson de Brito Vieira e Prof. Dr. Euclides Matheucci Júnior** pela prontidão em aceitar o convite e a paciência de ler esse extenso trabalho.

Ao **Prof. Dr. Anderson Cunha** e ao **Prof. Dr. Iran Malavazi** pelas orientações, sugestões e o compartilhamento de conhecimento durante a realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez e Prof. Dr. Vilmar Baldissera** por me receberem de braços abertos no Laboratório de Fisiologia do Exercício (Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar). Obrigado pelos ensinamentos e todo o auxílio no desenvolvimento dos trabalhos que realizamos juntos.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci** (Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – FUNDHERP) pelo auxílio com as análises de expressão gênica desse estudo. Fui muito bem recebido e assistido por toda a sua equipe. Gostaria também de expressar a minha gratidão pela colaboração das técnicas **Marli**, e em especial a **Amélia e Josiane** (Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP) por me auxiliarem em todas as etapas dos

experimentos de expressão gênica e me ensinarem com muita paciência todos os procedimentos.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Bezerra de Menezes Reiff** por toda a assistência com os procedimentos das biópsias musculares dos estudos desta tese. Sou muito grato também aos membros de sua equipe, **Mathias** e **Mirian**, por toda ajuda e colaboração durante o andamento da pesquisa.

Aos amigos **Rodrigo Pimenta, Cleber Souza, Carlos Gavas, Rodrigo de Marche Baldon, Gisele Zanca, Vivian Arakelian, Paulo Tiba, Hugo Eiti Yanagihara, Ricardo Vinicius dos Santos, Fabrício Wodewotzky, Giovanna Lessi, Paula Serrão, Karina Gramani Say, Danilo Bertucci e Dechristian Barbieri** pelo companheirismo, apoio e ajuda durante a realização desse trabalho. Sou muito grato a todos vocês por me ajudarem a chegar ao final dessa etapa tão importante para mim!

Agradeço à **Equipe de Voleibol Masculina do São Bernardo Vôlei** por permitir a realização de um dos estudos da tese e me proporcionar excelentes momentos. Agradeço em especial à comissão técnica pela confiança, ao preparador físico **Marcelo Zangrande** e ao treinador **Roberley Leonaldo**.

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pelo suporte financeiro com bolsas de estudo no Brasil e no exterior. Sou muito grato à FAPESP por todo o apoio que me foi dado.

Por fim, agradeço a minha madrinha **Maria de Fátima**; e **minha família** que sempre foi e será a minha base, meu porto seguro. Muito obrigado por todo o amor, carinho e principalmente por todos os ensinamentos. Em especial, aos **meus pais** que são os meus melhores amigos, conselheiros, meus educadores, os meus heróis, enfim, são os meus pais!

RESUMO

Recentes estudos têm utilizado as terapias por laser (LLLT) e LEDs (*light-emitting diodes* - LEDT) de baixa intensidade para o aumento de desempenho muscular em modelos experimentais e estudos clínicos randomizados. No entanto, os efeitos dessas terapias sobre o tecido muscular ainda não são bem compreendidos, principalmente em relação aos seus mecanismos de ação e utilização clínica. Assim, o objetivo dessa tese foi investigar os efeitos da LLLT e LEDT sobre o tecido muscular utilizando modelos *in vitro*, experimental e clínico para elucidar os principais mecanismos de ação dessas terapias sobre o tecido muscular submetido a testes de resistência à fadiga e/ou programas de treinamento físico para guiar a prática clínica. Dentre os mecanismos de ação, destacamos uma modulação do metabolismo mitocondrial, síntese de ATP (adenosina trifosfato) e glicogênio, proliferação de células musculares, defesas antioxidantes e uma modulação de expressão gênica quantificada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e *microarrays* (todo o genoma humano). Para consecução desses objetivos, realizamos um estudo *in vitro* com cultura de células de linhagem muscular, dois estudos experimentais com animais submetidos a testes de fadiga e treinamento físico, e cinco estudos clínicos que investigaram os efeitos da LLLT e LEDT no pré-condicionamento muscular (aplicação antes do exercício físico) e na recuperação muscular pós-exercício (aplicação após os exercícios) em atletas, não atletas e homens jovens geneticamente comparáveis (gêmeos idênticos) submetidos a jogos oficiais de voleibol, testes de esforço submáximo, máximo, e programas de treinamento físico, respectivamente. Os estudos *in vitro*, experimental e clínicos, além da extensa revisão bibliográfica incluída nessa tese, nos permitiu entender que existe um tempo-resposta para as células musculares absorverem a energia dos lasers/ LEDs e transformarem essa energia em respostas bioquímicas para o aumento de desempenho muscular em regimes de pré-condicionamento muscular, ou acelerar a recuperação muscular pós-exercício. Também, a LLLT/ LEDT aplicada sobre o tecido muscular exhibe um padrão de dose-resposta que parece ser dependente do objetivo da terapia, ou seja, prevenção de dano muscular ou estímulo ao metabolismo energético, síntese de ATP, expressão gênica e melhor desempenho muscular.

Palavras-chave: LLLT, LED, *microarrays*, RT-PCR, desempenho muscular, fadiga.

ABSTRACT

Recent studies have used low-level laser therapy (LLLT) and LEDs (light-emitting diodes - LEDT) to increase muscle performance in experimental models and randomized clinical trials. However, the effects of these therapies on muscle tissue are not well understood, especially related to their mechanisms of action and clinical use. The objective of this thesis was to investigate the effects of LLLT and LEDT on muscle tissue through *in vitro*, experimental models and clinical trials to elucidate the main mechanisms of action of these therapies on muscle tissue submitted to fatigue tests and/or strength training programs to guide the clinical practice. Among the mechanisms of action, we highlight a modulation of mitochondrial metabolism, synthesis of ATP (adenosine triphosphate) and glycogen, muscle cell proliferation, antioxidant defenses and a gene expression modulation quantified by real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and microarrays (whole human genome). To accomplish these objectives, we conducted an *in vitro* study with muscle cell line culture, two experimental studies with animals submitted to fatigue tests and physical training, and five clinical studies that investigated the effects of LLLT and LEDT on muscular pre-conditioning (LLLT/ LEDT application before exercise) and post-exercise muscle recovery (LLLT/ LEDT application after exercise) in athletes, non-athletes and young men genetically comparable (identical twins) submitted to official games of volleyball, sub maximal and maximal tests of effort, and physical training programs, respectively. *In vitro*, experimental and clinical studies, added to an extensive literature review included in this thesis, allowed us to understand that there is a time-response to muscle cells absorb the energy of lasers/ LEDs and transform that energy into biochemical responses to increase muscle performance in muscular pre-conditioning regimen, or accelerate post-exercise muscle recovery. In addition, LLLT/ LEDT applied over the muscle tissue shows also a pattern of dose-response which appears to be dependent of the objective, i.e., prevention of muscle damage or stimulation of energy metabolism, ATP synthesis, gene expression and improved muscle performance.

Keywords: LLLT, LED, microarrays, RT-PCR, muscle performance, fatigue.

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Fototerapia por LLLT e LEDT no desempenho muscular: modelos experimentais 11

Tabela 2 – Fototerapia por LLLT e LEDT no desempenho muscular: ensaios clínicos 25

ESTUDO I

Tabela 1 – Todos os parâmetros da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*). Grupo Controle não recebeu a LEDT. 76

ESTUDO II

Tabela 1 – Parâmetros ópticos da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*). O grupo LEDT-Placebo recebeu a LEDT placebo (equipamento desligado) com o mesmo tempo de tratamento (90 seg). 99

ESTUDO III

Tabela 1 – Programação para os procedimentos de exercício e teste de desempenho muscular. 119

Tabela 2 – Parâmetros ópticos da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*). O grupo LEDT-Placebo recebeu a LEDT placebo (equipamento desligado) com o mesmo tempo de tratamento (90 seg). 122

ESTUDO IV

Tabela 1 – Dados antropométricos dos voluntários pré-treinamento. 179

Tabela 2 – Dados antropométricos dos voluntários pós-treinamento. 180

Tabela 3 – Desempenho muscular em dinamometria isocinética pré-treinamento. 181

Tabela 4 – Desempenho muscular em dinamometria isocinética pós-treinamento. 181

Tabela 5 – Carga no teste de 1RM em *leg press* pré e pós-treinamento. 182

Tabela 6 – Análises estatísticas. 183

Tabela 7 – Genes candidatos a endógenos (*housekeeping*) nos experimentos de *microarrays*. 192

Tabela 8 – Desenho dos pares de *primers* para avaliação de genes endógenos. 193

Tabela 9 – Desenho dos pares de *primers* dos genes sintetizados e utilizados para a validação dos resultados dos experimentos de *microarrays*. 196

Tabela 10 – Análises pareadas dos genes alvo para a validação dos resultados dos <i>microarrays</i> por RT-PCR.	203
Tabela 11 – Análises não pareadas dos genes alvo para a validação dos resultados dos <i>microarrays</i> por RT-PCR.	204
ESTUDO V	
Tabela 1 – Parâmetros da terapia LED (<i>light-emitting diode therapy</i> – <i>LEDT</i>)	226
Tabela 2 – Pares de iniciadores (<i>primers</i>) desenhados e utilizados nas análises de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR).	228
ESTUDO VI	
Tabela 1 – Parâmetros da terapia LED (<i>light-emitting diode therapy</i> – <i>LEDT</i>). Terapia Placebo (30 seg) não emitiu luz (0 J e 0 mW).	242
ESTUDO VII	
Tabela 1 – Resultados dos parâmetros funcionais no limiar de anaerobiose ventilatório (LAV) e pico do teste cardiopulmonar (TECP) realizado em esteira ergométrica utilizando protocolo em rampa para determinar a carga de trabalho nos testes de carga constante (TCC).	258
Tabela 2 – Parâmetros da LEDT (<i>light-emitting diode therapy</i>) e regiões de aplicação antes da realização de cada um dos testes de carga constante (TCC).	261
Tabela 3 – Resultados para a creatina quinase (U/L) e lactato no sangue (mmol/L) e análises metabólicas baseadas em ¹ H NMR (mM) em urina. Os dados foram expressos em valores de concentração absoluta, percentual de mudança e normalizados pelo tempo limite de exercício realizado (Tlim).	270
ESTUDO VIII	
Tabela 1 – Parâmetros da terapia LED (<i>light-emitting diode therapy</i> – <i>LEDT</i>) e local de aplicação da LEDT sobre os membros inferiores antes do protocolo de exercício (PRBS).	288
Tabela 2 – Resultados da concentração de lactato sanguíneo (mmol.l ⁻¹) antes e após cada protocolo PRBS (<i>pseudorandom binary sequence</i>) realizado no período da manhã (PRBS-30min) e à tarde (PRBS-6h) usando a terapia LED (<i>light-emitting diode therapy</i> – <i>LEDT</i>) ou Placebo.	295

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
REVISÃO DA LITERATURA	
Figura 1 - Número de pontos de irradiação sobre o quadríceps femoral utilizando a terapia laser de baixa intensidade (<i>low-level laser therapy - LLLT</i>) ou terapia por LED (<i>light-emitting diode therapy - LEDT</i>). A (LEAL JUNIOR <i>et al.</i> , 2009a); B (DE MARCHI <i>et al.</i> , 2011); C (FERRARESI <i>et al.</i> , 2011) e D (VIEIRA <i>et al.</i> , 2012).	32
Figura 2 – (FERRARESI <i>et al.</i> , 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). (A) Pontos de irradiação da terapia laser de baixa intensidade (<i>low-level laser therapy - LLLT</i>) sobre o quadríceps femoral. (B) Mecanismo de lançadeira de creatina mitocondrial. (C) Oxidação de lactato pelo via mitocondrial.	39
Figura 3 – (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Desprotonação da histidina e formação da ligação de N-Zn (Nitrogênio-Zinco) para restaurar o centro ativo e atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) por terapia laser de baixa intensidade (<i>low-level laser therapy - LLLT</i>) ou terapia por LED (<i>light-emitting diode therapy - LEDT</i>).	47
Figura 4 – (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Efeitos da terapia laser de baixa intensidade (<i>low-level laser therapy - LLLT</i>) ou terapia por LED (<i>light-emitting diode - LEDT</i>) sobre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) de produção e de enzimas antioxidantes. NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida) oxidase; : diminuição ou inibição de produção.	48
Figura 5 – (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Efeitos da terapia laser de baixa intensidade (<i>low-level laser therapy - LLLT</i>) ou terapia por LED (<i>light-emitting diode therapy - LEDT</i>) sobre espécies reativas de oxigênio (ROS); espécies reativas de nitrogênio (RNS); mitocôndrias e contração muscular. SERCA= bomba de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático. Linha tracejada= atividade inibida. = diminuição da função ou inibido.	49
Figura 6 – (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Sinalização para biogênese mitocondrial, síntese de proteínas e degradação de proteínas modulada pela terapia a laser de baixa intensidade (<i>low-level laser therapy - LLLT</i>) associado ao exercício. Caixas em cinza referem-se à super expressão do gene e caixas em preto referem-se à repressão do gene.	55
Figura 7 – (FERRARESI e PARIZOTTO, 2013). Terapia por LED (<i>light-emitting diode therapy - LEDT</i>) em paciente com Distrofia Muscular Duchenne (DMD).	63

ESTUDO I

Figura 1 – Miotubos formados a partir de células musculares de camundongos (C2C12). Aparato experimental para a irradiação das microplacas branca e preta contendo os miotubos formados a partir de células musculares (C2C12) usando a terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*) sem contato.

76

Figura 2 – TMRM. Análise do potencial de membrana mitocondrial usando *tetramethyl rhodamine methyl ester* (TMRM) marcado em vermelho. Imagens com ampliação de 40x. Siglas: Terapia LED= LEDT (*light-emitting diode therapy*); UA= unidade arbitrária; C= grupo controle; 5min= grupo LEDT-5min; 24h= grupo LEDT-24h; *= significância estatística ($P < 0,05$) usando análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

79

Figura 3 – ATP e coeficiente de correlação de Pearson (r). **A)** Análise do conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) entre os grupos. **B)** Coeficiente de correlação de Pearson (índice r) entre ATP e o potencial de membrana mitocondrial usando TMRM. Siglas: LEDT= Terapia LED (*light-emitting diode therapy*); TMRM= *tetramethyl rhodamine methyl ester*; nmol= nanomol; UA= unidade arbitrária; C= grupo controle; 5min= grupo LEDT-5min; 24h= grupo LEDT-24h; *= significância estatística ($P < 0,05$) usando análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

81

Figura 4 – Mecanismo de ação da LEDT sobre a mitocôndria. **A)** Mitocôndrias de miotubos formados de células musculares de camundongos (C2C12) sem os efeitos da fototerapia por laser (*low-level laser therapy – LLLT*) ou LEDs (*light-emitting diode therapy – LEDT*). Há um fluxo normal de elétrons (seta vermelha) através de todos os complexos da cadeia transportadora de elétrons; um bombeamento normal de íons H^+ ; síntese de ATP normal e uma modesta incorporação de TMRM pela matriz mitocondrial. **B)** Mitocôndrias de miotubos formados de células musculares de camundongos (C2C12) após 3 a 6 horas da aplicação de LEDT. Há um aumento no fluxo de elétrons (seta vermelha mais grossa); aumento no bombeamento de íons H^+ , na síntese de ATP e uma maior incorporação de TMRM pela matriz mitocondrial. Siglas: I, II, III, IV e V= complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial; H^+ = próton de hidrogênio; e^- = elétron de hidrogênio; O_2 = oxigênio; H_2O = água metabólica; Q= quinona; Cox= citocromo c oxidase; ATP= adenosina trifosfato; ADP= adenosina difosfato; Pi= fosfato inorgânico; TMRM= *tetramethyl rhodamine methyl ester*.

87

ESTUDO II

Figura 1 – Randomização e grupos. Cinquenta camundongos machos Balb/c foram primeiramente alocados em 2 grupos iguais: LEDT-ATP e LEDT-Fadiga. Em seguida, ambos os grupos foram subdivididos em 5 grupos iguais: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. Siglas: terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*); ATP = adenosina trifosfato. 95

Figura 2 – Escada. Escada inclinada (80°) com 100 x 9 cm (comprimento e largura, respectivamente) usada para o teste de fadiga. Tubo Falcon preenchido com água e fixado à cauda do camundongo. 98

Figura 3 – LEDT. **A)** Distribuição interna do arranjo de LEDs (*light-emitting diodes*). LEDs brancos emitem luz vermelha (630 ± 10 nm) e LEDs amarelos emitem luz infravermelha (850 ± 20 nm). **B)** Posicionamento dos camundongos para receberem a terapia LED (LEDT) sem contato sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas. 99

Figura 4 – ATP, teste de fadiga e correlações (n= 5 animais por subgrupo). **A)** Conteúdos de ATP no músculo sóleo para os subgrupos do grupo LEDT-ATP: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. **B)** Conteúdos de ATP no músculo gastrocnêmio para os subgrupos do grupo LEDT-ATP: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. **C)** Teste de fadiga para os subgrupos do grupo LEDT-Fadiga: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. **D)** Coeficiente de correlação de Pearson (índice *r*) entre o conteúdo ATP no músculo sóleo e o teste de fadiga. **E)** Coeficiente de correlação de Pearson (índice *r*) entre o conteúdo ATP no músculo gastrocnêmio e o teste de fadiga. Siglas: LEDT = Terapia LED (*light-emitting diode therapy*); ATP = adenosina trifosfato; P= LEDT-Placebo; 5 min= LEDT-5min; 3h= LEDT-3h; 24h= LEDT-24h; *= significância estatística ($P < 0,05$). 105

ESTUDO III

Figura 1 – Escada. Escada inclinada (80°) com 100 x 9 cm (comprimento e largura, respectivamente) utilizada para o programa de treinamento e avaliações de desempenho muscular. Tubo Falcon preenchido com água e fixado à cauda do camundongo. 118

Figura 2 – LEDT. Posicionamento dos animais e aplicação da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*) sobre os membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas sem contato. 123

Figura 3 – Cirurgia. Após a anestesia, os camundongos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para a retirada dos músculos gastrocnêmio, sóleo e quadríceps femoral. O gastrocnêmio e sóleo foram separados cirurgicamente antes das análises. 124

Figura 4 – Desempenho Muscular (n= 5 animais por grupo). **A)** Teste de 3 repetições máximas (3RM) na linha de base (pré) e final (pós) mensurando a carga total carregada pelos animais durante esse teste. *: significância estatística ($P < 0,05$) comparando a carga final do teste de 3RM entre os grupos. **B)** Número de repetições ou escaladas realizadas pelos animais tratados com diferentes regimes de LEDT durante o programa de treinamento progressivo. **C)** Potência muscular desenvolvida pelos animais de cada grupo tratados com diferentes regimes de LEDT durante o programa de treinamento progressivo. **D)** Trabalho muscular desenvolvido pelos animais de cada grupo tratados com diferentes regimes de LEDT durante o programa de treinamento progressivo. * significância estatística ($P < 0,05$) comparada ao grupo LEDT-Placebo. # significância estatística ($P < 0,05$) comparada ao grupo LEDT-Após. & significância estatística ($P < 0,05$) comparada ao grupo LEDT-Antes. Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. A carga do teste de 3RM na linha de base (pré) *versus* final (pós) foi analisada por análise de variância (ANOVA) de duas vias (*two-way*) com medidas repetidas e *post hoc* de Tukey HSD. Número de repetições (escaladas), trabalho e potência muscular foram analisados por ANOVA de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

133

Figura 5 – Conteúdo de ATP Muscular e Glicogênio (n= 5 animais por cada grupo treinado, n= 2 animais no grupo Controle). **A)** Conteúdo de Adenosina Trifosfato (ATP) no músculo gastrocnêmio após o programa de treinamento. * significância estatística ($P < 0,05$). Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. Controle (C)= grupo controle, ou seja, sem exercício ou avaliação de desempenho muscular. Para as comparações entre todos os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

135

Figura 6 – Marcadores de Estresse Oxidativo no músculo quadríceps femoral (n= 5 animais por cada grupo treinado, n= 2 animais no grupo Controle). **A)** Glutaciona Total (glutaciona reduzida – GSH). **B)** Glutaciona Oxidada (GSSG). **C)** Proteína Carbonilada. **D)** Atividade da Catalase. **E)** Peroxidação Lipídica usando TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). **F)** Proteína Tiol. * significância estatística ($P < 0,05$). Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. Controle (C)= grupo controle, ou seja, sem exercício ou avaliação de desempenho muscular. Para as comparações entre todos os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

137

Figura 7 – Células musculares em estado proliferativo e mionúcleos adultos em músculo gastrocnêmio (n= 5 animais por cada grupo treinado; n= 2 animais no grupo Controle). Imunofluorescência para BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) marcou as células musculares em estado proliferativo. Todas as imunomarcações em vermelho indicam novos mionúcleos em formação. Os pontos em cor roxa significam uma mescla de imunomarcação vermelha (novos mionúcleos em formação) e azul (mionúcleos adultos). DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) marcou mionúcleos adultos já formados. As imagens foram fotografadas em microscópio confocal (Olympus America Inc. Center Valley, PA, USA) com uma ampliação de 20x e zoom de 1x e 3x. As imunomarcações para BrdU e DAPI foram quantificadas usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD). * significância estatística ($P < 0,05$). Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. Controle (C)= grupo controle, ou seja, sem exercício ou avaliação de desempenho muscular. Para as comparações entre todos os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

139

Figura 8 – Metabolismo Mitocondrial no músculo gastrocnêmio (n= 5 animais por cada grupo treinado; n= 2 animais no grupo controle). A análise de imunofluorescência para citocromo c oxidase subunidade IV

(COX IV) imunomarcou as células musculares com metabolismo mitocondrial em amarelo. As imagens foram fotografadas em microscópio confocal (Olympus America Inc. Center Valley, PA, USA) com uma ampliação de 20x e zoom de 1x and 3x. COX IV foi quantificada usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD). * significância estatística ($P < 0,05$). Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. Controle (C)= grupo controle, ou seja, sem exercício ou avaliação de desempenho muscular. Para as comparações entre todos os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

ESTUDO IV

- Figura 1** – Desenho experimental do estudo. 141
- Figura 2** – Posicionamento do voluntário no dinamômetro isocinético (lado esquerdo da figura) e amplitude de movimento desenvolvida na avaliação isocinética (lado direito da figura). 156
- Figura 3** – Posicionamento do voluntário no teste de uma repetição máxima em *leg press* (1RM) (lado esquerdo da figura) e determinação da amplitude de movimento nessa avaliação (centro e lado direito da figura). 160
- Figura 4** – Aplicação da laserterapia de baixa intensidade (*low-level laser therapy* – LLLT) sobre a coxa dos voluntários imediatamente após uma sessão de treinamento. 161
- Figura 5** – Assepsia da região da coxa (lado esquerdo da figura) e anestesia local com xilocaína a 2% sobre a região do vasto lateral (lado direito da figura). 163
- Figura 6** – Local da biópsia do músculo vasto lateral, conforme seta e indicação de número 3. 164
- Figura 7** – Incisão realizada com lâmina de bisturi (lado esquerdo da figura) e introdução da agulha de biópsia no músculo vasto lateral (lado direito da figura). 165
- Figura 8** – Fragmento muscular (lado esquerdo da figura) e armazenamento em nitrogênio líquido (lado direito da figura). 166
- Figura 9** – Incisão da biópsia (lado esquerdo da figura) e oclusão com micropore (lado direito da figura). 167

Figura 10 – Investigação da integridade do RNA mensageiro (RNAm) em eletroforese em gel de agarose. Amostra 13 é controle; amostras 15 e 19 foram descartadas.	169
Figura 11 – Gasket e câmaras de hibridação Agilent (lado esquerdo da figura) e forno de hibridação Agilent (lado direito da figura).	172
Figura 12 – Distribuição das amostras dos grupos GT e GTL para a hibridação com os chips de <i>microarrays</i> .	173
Figura 13 – Chip de <i>microarray</i> escaneado após hibridação.	174
Figura 14 – Chip de <i>microarray</i> e suas sondas para hibridação com a amostra investigada.	175
Figura 15 – Indicadores de qualidade das hibridações: gráfico do coeficiente de variação dos sinais de fluorescência obtidos para os diferentes controles (esquerda) e a relação linear entre o sinal obtido e a concentração dos Spikes (direita) do experimento de <i>microarray</i> da amostra GT1 pré.	175
Figura 16 – Normalização da intensidade dos valores de expressão através da mediana. Análise pareada para o grupo GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).	177
Figura 17 – Normalização da intensidade dos valores de expressão através da mediana. Análise pareada para o grupo GT (grupo treinamento).	178
Figura 18 – Normalização da intensidade dos valores de expressão através da mediana. Análise não-pareada entre os grupos GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade) e GT (grupo treinamento) na condição pós-treinamento.	178
Figura 19 – Sumário do número de genes diferencialmente expressos e classificados de acordo com a sua magnitude de mudança (<i>fold change</i> – FC) e valor de <i>P</i> para o grupo GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).	184
Figura 20 – Distribuição dos genes diferencialmente expressos no grupo GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade) de acordo com a magnitude de mudança (<i>fold change</i> – FC). A= FC de 1,0; B= FC de 1,5; C= FC de 2,0; D= FC de 3,0; E= FC de 4,0.	185
Figura 21 – Sumário do número de genes diferencialmente expressos e classificados de acordo com a sua magnitude de mudança (<i>fold change</i> – FC) e valor de <i>P</i> e para o grupo GT (grupo treinamento).	186
Figura 22 – Distribuição dos genes diferencialmente expressos no grupo GT (grupo treinamento) de acordo com a magnitude de mudança (<i>fold change</i> – FC). A= FC de 1,0; B= FC de 1,5; C= FC de 2,0; D= FC de 3,0; E= FC de 4,0.	187
Figura 23 – Sumário do número de genes diferencialmente expressos e classificados de acordo com a sua magnitude de mudança (<i>fold change</i> – FC) e valor de <i>P</i> entre os grupos GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade) e grupo GT (grupo treinamento) pós-treinamento.	188

Figura 24 – Distribuição dos genes diferencialmente expressos entre os grupos GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade) de acordo com a magnitude de mudança (*fold change* – FC) pós-treinamento. A= FC de 1,0; B= FC de 1,5; C= FC de 2,0; D= FC de 3,0; E= FC de 4,0. 189

Figura 25 – Diagrama de Venn ilustrando a análise de intersecção dos genes significativamente expressos em ambos os grupos (GTL e GT). GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade). 190

Figura 26 – Análise da estabilidade ou menor variação de expressão dos genes candidatos a endógenos para os experimentos de *microarrays* para ambos os grupos do estudo: GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade). 192

Figura 27 – Análise da estabilidade ou menor variação de expressão dos genes candidatos a endógeno analisados em RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real) considerando ambos os grupos da pesquisa: GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade). 195

Figura 28 – **A)** Gráficos que representam 4 genes (AKT1, MTOR, MSTN e TRIM63) significativamente expressos nas análises pareadas de *microarrays* e confirmados por RT-PCR para o grupo GTL. **B)** Gráficos que representam os mesmos genes (AKT1, MTOR, MSTN e TRIM63) que não foram diferencialmente expressos nas análises pareadas de *microarrays* e confirmados por RT-PCR para o grupo GT. Todos os resultados foram expressos em magnitude de mudança (*fold change*) e a validação desses resultados foi confirmada por RT-PCR. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real; GTL= grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade; GT= grupo treinamento; * significância estatística ($P < 0,05$) (pré *versus* pós-treinamento). 200

Figura 29 – **A)** Gráficos que representam 3 genes (CS, SOD2 e NFKB) não significativamente expressos nas análises pareadas de *microarrays* e confirmados por RT-PCR para o grupo GTL. **B)** Gráficos que representam os mesmos genes (CS, SOD2 e NFKB) que também não foram diferencialmente expressos nas análises pareadas de *microarrays* e confirmados por RT-PCR para o grupo GT. Todos os resultados foram expressos em magnitude de mudança (*fold change*) e a validação desses resultados foi confirmada por RT-PCR. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real; GTL= grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade; GT= grupo treinamento. 201

Figura 30 – Gráficos que representam 3 genes diferencialmente expressos nas análises não pareadas de *microarrays* entre os grupos GT e GTL. Todos os resultados foram expressos em magnitude de mudança (*fold change*) e a validação desses resultados foi confirmada por RT-PCR. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real; GTL= grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade; GT= grupo treinamento; * significância estatística ($P < 0,05$) (GT pós-treinamento *versus* GTL pós-treinamento). 202

Figura 31 – Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de forma global para o grupo treinamento (GT). Genes em branco não pertencem ao banco de dados do grupo analisado, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações. 205

Figura 32 – Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de genes relacionados às mitocôndrias celulares do grupo treinamento (GT). Genes em branco não pertencem ao banco de dados do grupo analisado, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações. 206

Figura 33 – Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de forma global para o grupo treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade (GTL). Genes em branco não pertencem ao banco de dados do grupo analisado, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações. 207

Figura 34 – Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de genes relacionados às mitocôndrias celulares do grupo treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade (GTL). Genes em branco não pertencem ao banco de dados do grupo analisado, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações. 208

Figura 35 – Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de forma global para o grupo treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade (GTL) pós-treinamento em relação ao grupo treinamento (GT) pós-treinamento. Genes em branco não pertencem ao banco de dados dos grupos analisados, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações. 219

Figura 36 – Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de forma global para o grupo treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade (GTL) pós-treinamento em relação ao grupo treinamento (GT) pós-treinamento. Genes em branco não pertencem ao banco de dados dos grupos analisados, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações. 210

Figura 37 – Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) relacionados às mitocôndrias celulares. Análises entre os grupos GTL (treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade) pós-treinamento em relação ao GT (grupo treinamento pós-treinamento). Genes em branco não pertencem ao banco de dados dos grupos analisados, mas

foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações.

211

ESTUDO V

Figura 1 – Sequencia das atividades durante uma sessão de treinamento. Exercício em *leg press* (primeira atividade); exercício em cadeira extensora (segunda atividade); LEDT ou Placebo imediatamente após os exercícios (terceira atividade). Sigla: Terapia LED= (*light-emitting diode therapy – LEDT*).

225

Figura 2 – Resultados das análises genômicas para os dezesseis loci testados (Amelogenin, D3S1358, D5S818, vWA, TH01, D13S317, D8S1179, D21S11, D7S820, TPOX, D16S539, D18S51, CSF1PO, FGA, Penta E, Penta D) para os dois irmãos. A imagem superior é do irmão nº 1, e a imagem inferior é do irmão nº 2.

229

Figura 3 – **A)** Resultados em percentual de mudanças (%) para o desempenho muscular após o programa de treinamento para o teste de uma repetição máxima (1RM) em *leg press* (LP) e cadeira extensora (CE) e teste de fadiga em dinamômetro isocinético; mudanças percentuais de creatina quinase (CK) no sangue relacionadas à primeira (1°), décima terceira (13°), vigésima quinta (25°) e trigésima sexta (36°) sessões de treinamento; mudanças na escala visual analógica (VAS) em centímetros (cm) relacionadas a primeira (1°), décima terceira (13°), vigésima quinta (25°) e trigésima sexta (36°) sessões de treinamento. **B)** Imagens de Ressonância Magnética (MRI) dos músculos da coxa antes (linha de base – pré) e após (final) o programa de treinamento. Doze fatias e lacunas foram utilizadas para calcular o volume muscular. Imagens do nível 5 (fatia nº 5) para ambos os gêmeos estão representando a diferença total entre as terapias levando em consideração todos as 12 fatias e lacunas. Os resultados foram apresentados em percentual de mudanças (%).

231

Figura 4 – Lado esquerdo da figura representa a variação de expressão gênica (*fold change – FC*) para IL1- β (*interleukin-1- β*), MSTN (*myostatin*), mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) e SOD2 (*superoxide dismutase 2, mitochondrial*). Lado direito da figura é o suposto efeito da fototerapia por lasers (*low-level laser therapy – LLLT*) e LEDs (*light-emitting diode therapy – LEDT*) na sinalização de células musculares em humanos. Genes coloridos foram modulados pela fototerapia. Siglas. CTE= cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

232

ESTUDO VI

Figura 1 – Arranjo de 200 LEDs (*light-emitting diodes*): 100 LEDs emitindo luz infravermelha (850 ± 20 nm) dispostos em 25 arranjos de 4 LEDs (LEDs amarelos) mais 100 LEDs emitindo luz vermelha (630 ± 10 nm) dispostos em 25 arranjos de 4 LEDs (LEDs brancos).

242

Figura 2 – Percentuais de mudança (%) da atividade da creatina quinase (CK) no sangue entre os grupos. Siglas: Terapia LED= *light-emitting diode therapy* – LEDT; * significância estatística ($P < 0,05$) em análise de variância (ANOVA) de duas vias (*two-way*) com medidas repetidas e *post hoc* de Tukey HSD.

245

ESTUDO VII

Figura 1 – Procedimentos do estudo e grupos musculares irradiados pela LEDT (*light-emitting diode therapy*): A) bíceps braquial e tríceps braquial; B) oblíquo externo e grande dorsal; C) quadríceps femoral; D) isquiotibiais; E) tibial anterior e fibulares; F) gastrocnêmio e sóleo. A ordem de cada terapia (LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo) foi randomizada. A sequência de aplicação da LEDT não foi randomizado e respeitou a seguinte sequência: F, E, D, C, B, A. Siglas. R= intervalo de dias entre os testes de carga constante; LAV= limiar anaeróbico ventilatório.

260

Figura 2 – Valores de VO_2 , a_0 , a_1 e a_2 ; TD_1 e TD_2 durante os testes de carga constante (TCC): LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo. **Siglas:** VO_2 (consumo de oxigênio); a_0 (média de VO_2 durante o aquecimento no exercício), a_1 (amplitude de VO_2 muscular na fase muscular); a_2 (amplitude “extra” de VO_2 na fase de componente lento); TD_1 (tempo de atraso para iniciar a fase muscular); TD_2 (tempo de atraso para o início da fase de componente lento); LEDT (*light-emitting diode therapy*).

267

Figura 3 – Comparações entre os testes de carga constante (TCC): LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo. **Siglas:** T_{lim} (tempo limite de exercício); “ τ_1 ” (velocidade de ajuste do consumo de oxigênio (VO_2) muscular); L (litros); LEDT (*light-emitting diode therapy*). Note nessa figura que foram plotadas linhas pontilhadas para demonstrar a tendência ou linearidade para a adaptação esperada após múltiplos testes de carga constante. No entanto, após a LEDT-Efetivo, houve uma clara quebra de linearidade ou tendência, sugerindo efeitos benéficos da LEDT sobre a cinética de VO_2 .

268

ESTUDO VIII

Figura 1 – Fluxograma (1A) e protocolo de exercício (PRBS) (1B). Siglas: LEDT= *light-emitting diode therapy*; PRBS= *pseudorandom binary sequence exercise*.

285

Figura 2 – Arranjo de 200 LEDs (*light-emitting diodes*): 100 na faixa do infravermelho (830 nm) agrupados em 25 arranjos de 4 LEDs; 100 na faixa do vermelho (630 nm) agrupados em 25 arranjos de 4 LEDs.

287

Figura 3 – A) Descrição de tempo-resposta hipotética para VO_2 e que varia a velocidade de adaptação (exemplos de cinéticas lentas para rápida para uma dada alteração na carga de trabalho (PRBS - *pseudorandom binary sequence*). Esses mesmos dados podem ser traduzidos para o domínio da frequência (3B) onde a amplitude de VO_2 para cada função sinusoidal pode ser calculada para cada frequência específica. Observa-se que uma cinética mais rápida apresenta amplitudes maiores para uma dada

frequência. Figura 3C é uma representação da resposta de VO₂ de um voluntário. A janela de dados corresponde ao intervalo de 150-300 seg (30 seg de 25 W e 120 seg de 100 W) do protocolo PRBS original. O tempo foi rearranjado a fim de ajustar os dados utilizando uma função exponencial iniciando no tempo zero. Para este mesmo participante, toda a resposta de VO₂ no PRBS foi analisada no domínio da frequência (como descrito na figura 3B). Considerando-se a linearidade da resposta de entrada e saída, o sinal de VO₂ foi ajustado de volta para o domínio do tempo pela soma (princípio da superposição) de cada sinusoidal ajustada (Figura 3D). Siglas: PRBS = *pseudorandom binary sequence* e VO₂ = consumo de oxigênio. 290

Figura 4 – Resultados das amplitudes para as harmônicas 1 (2 mHz) a 6 (13 mHz). Siglas: VO₂= consumo de oxigênio; VCO₂= produção de dióxido de carbono; FC= frequência cardíaca; \dot{Q} = débito cardíaco; LEDT= *light-emitting diode therapy*. 294

Figura 5 – Gráficos de segundo a segundo para a resposta de VO₂ (símbolo ± desvio padrão) e a média da função exponencial (—, $\bar{a}VO_2 = \bar{a}a_0 + \bar{a}a * (1 - \exp^{-(\bar{a}t - \bar{a}TD)/\bar{a}\tau})$). 5A, B, C e D mostram a cinética de VO₂ para as condições: manhã-placebo, manhã-LEDT, tarde-placebo, tarde-LEDT, respectivamente. É importante observar a resposta semelhante para todas as condições, comparando os parâmetros da equação (média ± desvio padrão). Siglas: VO₂= consumo de oxigênio; LEDT= *light-emitting diode therapy*; a₀= linha de base para o VO₂; a= VO₂ no estado estável; \square = velocidade de ajuste do consumo de oxigênio (VO₂) e TD= é o tempo de atraso da resposta exponencial. 296

SUMÁRIO

	PÁGINA
REVISÃO DA LITERATURA	1
TEMA DE INTERESSE	65
HISTÓRICO DA COMPOSIÇÃO DA TESE	66
ESTUDO I: Fototerapia de baixa intensidade aumenta o potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP em miotubos formados por células musculares de camundongos (C2C12) com uma resposta pico entre 3-6 horas	
Introdução	71
Materiais e métodos	73
Resultados	78
Discussão	81
Conclusão	88
ESTUDO II: Tempo-resposta para o aumento de ATP e resistência à fadiga muscular após a fototerapia em camundongos	
Introdução	92
Materiais e métodos	94
Resultados	103
Discussão	105
Conclusão	110
ESTUDO III: Terapia LED (<i>light-emitting diode therapy - LEDT</i>) associada ao treinamento em camundongos aumenta a desempenho muscular, atividade da citocromo c oxidase, ATP, glicogênio, proliferação celular e defesas antioxidantes	
Introdução	113
Materiais e métodos	116
Resultados	130
Discussão	142
Conclusão	149
ESTUDO IV: Efeitos do laser de baixa intensidade sobre a modulação da expressão gênica global de homens jovens sob treinamento físico de força	
Introdução	152
Materiais e métodos	154
Resultados	179
Discussão	212

Conclusão	216
ESTUDO V: Fototerapia no treinamento de força: ensaio clínico duplo-cego e controlado com placebo em um par de gêmeos idênticos	
Introdução	220
Materiais e métodos	221
Resultados	228
Discussão	232
Conclusão	234
ESTUDO VI: Terapia LED (<i>light-emitting diode therapy - LEDT</i>) antes dos jogos previne incrementos de creatina quinase (CK) com dose-resposta em atletas de voleibol: estudo randomizado e duplo-cego controlado por placebo	
Introdução	237
Materiais e métodos	239
Resultados	244
Discussão	245
Conclusão	251
ESTUDO VII: Pré-condicionamento muscular usando terapia LED (<i>light-emitting diode therapy - LEDT</i>) para exercício de alta intensidade: estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo com um maratonista de elite	
Introdução	254
Materiais e métodos	257
Resultados	265
Discussão	271
Conclusão	278
ESTUDO VIII: Efeitos da fototerapia de baixa intensidade sobre a capacidade aeróbia em humanos: estudo duplo-cego, randomizado, cruzado e controlado por placebo	
Introdução	282
Materiais e métodos	284
Resultados	294
Discussão	297
Conclusão	300
CONSIDERAÇÕES FINAIS	301

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	304
APÊNDICES	322
ANEXOS	328

REVISÃO DA LITERATURA

Revisão publicada parcialmente no periódico *Photonics & Lasers in Medicine* (2012) e publicada parcialmente no *Handbook of Photomedicine – Chapter 53* (2013) – ANEXO I.

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

FERRARESI, C.; PARIZOTTO, N. A. Low-Level Laser Therapy and Light-Emitting Diode Therapy on Muscle Tissue: Performance, Fatigue, and Repair. *Handbook of Photomedicine*. Taylor & Francis, 2013. p. 611-630.

Revisão bibliográfica sobre as terapias laser e LED (fototerapia) e exercício físico atualizada até 01/07/2014

1. Introdução à fadiga muscular e adaptações musculares aos diferentes tipos de exercício físico

O intenso uso dos músculos em exercícios físicos de alta intensidade ou em muitas contrações musculares repetidas pode conduzir ao declínio de desempenho e o surgimento da fadiga muscular periférica (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010). A fadiga muscular é um fenômeno complexo, com muitas teorias e evidências científicas que elucidam o seu processo de instalação. Dentre as evidências científicas, destacamos a depleção de fontes energéticas como a fosfocreatina e glicogênio; acúmulo de fosfato inorgânico (Pi), adenosina difosfato (ADP), íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ e lactato; perda de sensibilidade ao Ca^{2+} pela miofibrila e maior produção ou acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) durante os exercícios (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010; WESTERBLAD e ALLEN, 2011).

As evidências científicas que explicam a fadiga muscular periférica sugerem que um ou mais dos seguintes eventos da contração muscular podem ser prejudicados (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010): (i) geração do potencial de ação na junção neuromuscular; (ii) propagação do potencial de ação ao longo do sarcolema e também pelo sistema de túbulos-T; (iii) ativação de sensores voltagem dependentes nas paredes dos túbulos-T para abertura dos canais de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático; (iv) liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático para dentro do sarcoplasma; (v) ligação do Ca^{2+} à troponina C (TnC) e movimentação da tropomiosina que expõe o sítio de ligação da actina com a miosina; (vi) formação das pontes cruzadas e início da contração muscular; (vii) constante

bombeamento de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático e diminuição da concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma; (viii) relaxamento muscular.

As fontes energéticas de produção de adenosina trifosfato (ATP) para a contração muscular podem ter o metabolismo aeróbio (oxidativo) ou anaeróbio predominante (alático e lático) (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010). O metabolismo aeróbio utiliza o ciclo de Krebs para a oxidação de acetil coenzima A (acetil-Coa) e redução dos cofatores NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FAD (flavina dinucleotídeo) que fornecerão prótons e elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (CTE) nas cristas mitocondriais. Na CTE o oxigênio (O_2) é o aceptor final dos prótons e elétrons para o processo de síntese de ATP e água metabólica. Já no metabolismo anaeróbio não há participação de O_2 para a produção de ATP: (i) o ATP pode ser produzido pela hidrólise da fosfocreatina (anaeróbio alático) e/ou (ii) produzido a partir da oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH)+H pelo piruvato proveniente da glicólise. Além de ATP, no segundo processo há formação de lactato (metabolismo anaeróbio lático) (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010).

Existem diferentes tipos de exercícios físicos, os quais promovem adaptações específicas no tecido muscular, como ajustes bioquímicos (metabolismo energético) e estruturais que conduzem a melhores desempenhos físicos (TONKONOJI *et al.*, 2000; TONKONOJI e SAHLIN, 2002; LIU *et al.*, 2003; AAGAARD, 2004; FRY, 2004; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010)

O exercício de força ou de alta intensidade promove (i) um maior recrutamento energético de forma anaeróbia (adaptação metabólica); (ii) aumenta a área de secção transversa do músculo esquelético (hipertrofia) via microlesões; (iii) modifica as

características contráteis das fibras musculares (transição entre as fibras do tipo I, IIx e IIb para o tipo IIa – adaptação estrutural); (iv) aumenta o recrutamento, sincronismo e frequência de disparos das unidades motoras do músculo em atividade (adaptação neural) e conduz ao desenvolvimento de maior força muscular (LIU *et al.*, 2003; AAGAARD, 2004; FRY, 2004; ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010).

Em contrapartida, o exercício de resistência ou de baixa intensidade (i) promove um maior recrutamento energético de forma aeróbia (adaptação metabólica); (ii) estimula as fibras musculares a desenvolverem mais mitocôndrias, aumentar o tamanho daquelas já existentes e proporciona maior densidade mitocondrial e de enzimas oxidativas nas fibras musculares (predomínio das fibras tipo I – adaptação estrutural); (iii) aumenta a produção de ATP pela via mitocondrial e aumenta a resistência à fadiga muscular nos exercícios físicos (TONKONOJI *et al.*, 2000; TONKONOJI e SAHLIN, 2002; COFFEY e HAWLEY, 2007; SAHLIN *et al.*, 2007; HAWLEY, 2009; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010).

Pensando sobre a fadiga muscular periférica e as adaptações metabólicas e estruturais do tecido muscular aos diferentes tipos de exercício físico, alguns autores utilizaram o laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy* - LLLT) para acelerar essas adaptações e prevenir ou reduzir a fadiga muscular (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2006). A escolha da LLLT nesses processos ocorreu possivelmente por esse recurso terapêutico modular o metabolismo energético via mitocôndrias celulares, reduzir processos inflamatórios, controlar a dor e acelerar o reparo tecidual (BAKEEVA *et al.*, 1993; KARU, 1999; LOPES-MARTINS *et al.*, 2005; CHOW *et al.*, 2009; ENWEMEKA, 2009; FULOP *et al.*, 2009). Os primeiros estudos com essa temática utilizaram modelos experimentais para identificarem os possíveis

efeitos da LLLT sobre o tecido muscular submetido ao estresse mecânico e metabólico do exercício físico. Em especial, a resistência muscular à fadiga e o metabolismo energético foram os focos desses trabalhos pioneiros (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2006).

2. Uso da fototerapia por laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy* - LLLT) e LED (*light-emitting diode therapy* - LEDT) na melhora de desempenho muscular, prevenção e recuperação acelerada das lesões musculares

2.1 Modelos experimentais que utilizaram a LLLT

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica por trabalhos que utilizaram a LLLT e a LEDT em modelos experimentais para aumentar o desempenho muscular em exercício; recuperar lesões decorrentes do exercício físico ou contração muscular; ou ainda prevenir lesões musculares oriundas também da contração muscular voluntária ou induzida por estimulação elétrica neuromuscular. A pesquisa utilizou os bancos de dados *PubMed* e *MEDLINE* entre o período de 1/6/1994 a 1/7/2014. Foram excluídos todos os trabalhos com propostas diferentes da melhora do desempenho, recuperação e/ou prevenção de dano muscular frente ao exercício físico, ou ainda aqueles que utilizaram metodologias de indução de lesão ou fadiga muscular não proveniente de contração muscular. Os termos usados na pesquisa foram: *phototherapy, low-level laser therapy (LLLT), light-emitting diode (LED), LED therapy (LEDT), rats, muscle, performance, fatigue, training, exercise, muscle damage*. Foram classificados 10 estudos experimentais.

O primeiro estudo foi o de LOPES-MARTINS *et al.* (2006) que verificaram os efeitos da LLLT (655 nm) sobre a fadiga muscular em ratos. Os autores induziram a

fadiga do tibial anterior por estimulação elétrica neuromuscular e quantificaram o decaimento do torque e o dano muscular por meio dos níveis sanguíneos de creatina quinase (CK). A LLLT foi aplicada antes da indução da fadiga sobre um único ponto no ventre do músculo tibial anterior dos animais. Os resultados indicaram que a LLLT aplicada antes da contração muscular reduziu a fadiga com dose de 0,5 J (Joule)/cm² e diminuiu o dano muscular com doses de 1,0 e 2,5 J/cm².

Os resultados do trabalho de LOPES-MARTINS *et al.* (2006) incentivaram outros pesquisadores a desenvolverem mais trabalhos experimentais em busca de se identificar mais efeitos da LLLT sobre o tecido muscular submetido a diferentes protocolos de exercícios físicos, bem como melhor entender os mecanismos de ação da LLLT para a redução da fadiga e dano muscular.

LIU *et al.* (2009) treinaram ratos em esteira em plano declinado (-16° de inclinação) na velocidade de 16 m/min até a exaustão dos animais. Os autores verificaram que a LLLT (632,8) aplicada sobre um único ponto do músculo gastrocnêmio de ratos inibiu a inflamação; reduziu a atividade da CK no soro sanguíneo, os níveis musculares de malondialdeído (MDA) 24h e 48h após o exercício e aumentou a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD).

Utilizando um protocolo de natação para indução de fadiga e dano muscular, SUSSAI *et al.* (2010) investigaram os efeitos da LLLT (660 nm) sobre os níveis de CK no plasma sanguíneo e a apoptose da célula muscular de ratos. A LLLT foi aplicada durante 40 segundos de irradiação sobre 1 ponto do músculo gastrocnêmio logo após o protocolo de fadiga. Comparado ao grupo controle, o grupo irradiado com LLLT teve os menores níveis de CK e apoptose celular 24h e 48h após a indução da fadiga.

PATROCINIO *et al.* (2013), utilizando o modelo de escada para o treinamento de ratos, também verificaram os efeitos da LLLT sobre o desempenho muscular. Os

autores ataram cargas à cauda dos animais durante os treinamentos, os quais foram realizados 3 vezes por semana, durante 5 semanas, com carga inicial de 75% da massa corporal dos animais e acrescentando-se 30g de carga a cada série. Cada treinamento foi composto de 4 séries com cargas progressivas de 50%, 75%, 90% e 100% referente à carga da última sessão de treinamento realizado. A LLLT (830 nm) foi aplicada com dose de 120 J/cm^2 (3,3 J) sobre ambos os músculos tibiais anterior dos animais logo após cada sessão de treinamento. Embora a participação do músculo tibial anterior não ser direta no exercício proposto, os resultados mostraram que após o programa de treinamento o grupo LLLT reduziu os níveis de lactato sanguíneo, diminuiu a depleção de glicogênio muscular e aumentou a área de secção transversa comparado aos grupos controle e treinamento sem LLLT, sugerindo, talvez, efeitos sistêmicos.

O modelo de estimulação elétrica neuromuscular para a indução de fadiga e dano muscular de LOPES-MARTINS *et al.* (2006) foi reproduzido posteriormente em mais estudos que investigaram os efeitos da LLLT sobre o tecido muscular. Como exemplo desses trabalhos, LEAL JUNIOR *et al.* (2010a) investigaram os efeitos da LLLT (904 nm) sobre a fadiga do músculo tibial anterior de ratos. A LLLT foi aplicada sobre um único ponto do músculo tibial anterior antes da indução da fadiga e com diferentes tempos de tratamento e energia total. Os grupos de 1 J (Joule) e 3 J tiveram os maiores picos de força comparados ao grupo controle (sem LLLT), 0,1 J e 0,3 J. Os níveis de lactato sanguíneo foram menores em todos os grupos irradiados com LLLT. A atividade da CK sanguínea foi também menor em todos os grupos irradiados, exceto no grupo 3 J.

Com a mesma metodologia do trabalho de LEAL JUNIOR *et al.* (2010a), DE ALMEIDA *et al.* (2011) identificaram que a LLLT (904 nm) e energia de 1 J diminuiu significativamente a atividade da CK sanguínea, reduziu os níveis de expressão de RNA mensageiro para ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e aumentou a expressão de ciclooxigenase-

1 (COX-1) comparado aos demais grupos. Os autores concluíram que a LLLT é efetiva para a prevenção do dano muscular e pode modular a expressão de genes responsáveis pela resposta inflamatória.

Recentemente SANTOS *et al.* (2014) investigaram os efeitos da LLLT quando aplicada imediatamente antes de contrações tetânicas induzidas por estimulação elétrica neuromuscular durante 60 minutos (uma a cada 10 minutos). Os autores testaram diferentes comprimentos de onda (660, 830 e 905 nm) e energias (1; 3 e 10 J). Os resultados mostraram que, para a redução de fadiga, a LLLT 660 nm /3 J e 905 nm/ 1 J promoveram melhores resultados. Mas para a redução do dano muscular, apenas a LLLT 660 nm/1 J reduziu significativamente os níveis de CK. Referente à morfologia muscular, análises qualitativas do estudo evidenciaram que o dano muscular foi menor nos grupos tratados com 660 nm/1 J e 3 J; 905 nm/1 J, 3 J e 10 J.

Por fim, (ALBUQUERQUE-PONTES *et al.*, 2014) investigaram os efeitos de diferentes comprimentos de onda de LLLT (660 nm; 830 nm; 905 nm), doses (1; 3 e 10 J) e tempo-resposta (5, 10, 30 minutos e 1, 2, 12 e 24 horas) sobre a atividade da citocromo c oxidase em músculos de ratos sem o estresse de exercícios. Os autores reportaram que a atividade da citocromo c oxidase foi aumentada com a LLLT 660 nm/1 J; 830 nm/3J; 905 nm/1 J em todos os tempos testados.

2.2 Modelos experimentais que utilizaram a LEDT

Foram encontrados três trabalhos que utilizaram a LEDT para o aumento de desempenho, recuperação e/ou prevenção de dano muscular frente ao exercício físico (CAMARGO *et al.*, 2012; CORAZZA *et al.*, 2013; DA COSTA SANTOS *et al.*, 2014).

Assim como no trabalho de SUSSAI *et al.* (2010), CAMARGO *et al.* (2012) utilizaram o protocolo de natação para a indução de fadiga e dano muscular. Nesse estudo, 3 grupos de animais nadaram por 100 minutos e o grupo controle não realizou nenhum exercício. Os animais submetidos à natação foram ainda subdivididos em 3 grupos: natação e sem terapia para recuperação muscular após o exercício; natação e crioterapia (banho de imersão em água a 10°C por 10 minutos) após o exercício; natação e LEDT (940 nm) sobre ambas as patas traseiras após o exercício. Os resultados mostraram que a área de necrose muscular e o infiltrado inflamatório no músculo sóleo diminuíram significativamente no grupo LED comparado aos grupos exercício e exercício associado à crioterapia. Comparado ao grupo exercício, apenas o grupo LEDT diminuiu significativamente os níveis sanguíneos de CK 24h após o protocolo de natação.

CORAZZA *et al.* (2013) investigaram os efeitos da LEDT (850 nm) sobre o aumento do volume muscular e mediadores inflamatórios de ratas ovariectomizadas submetidas a um protocolo de treinamento de salto com cargas progressivas (50 a 80% da massa corporal dos animais) durante 12 semanas. Os autores concluíram que todos os grupos treinados (treinamento e treinamento associado à LEDT) e o grupo LEDT (não treinado e irradiado com LEDT) aumentaram o volume muscular e as concentrações musculares de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1) comparado ao grupo controle (ovariectomizado, não treinado e não irradiado com LEDT). Também, apenas o grupo treinamento associado à LEDT aumentou significativamente o mediador anti-inflamatório IL-6 (*interleukin-6*) comparado aos grupos treinamento, LEDT e controle. Em contrapartida, o grupo controle teve a menor concentração dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α (*tumor necrosis factor -alfa*) e IL1- β (*interleukin 1-beta*) comparado aos demais grupos.

Por fim, com o intuito de avaliar os efeitos da crioterapia e LEDT no desempenho e dano muscular, DA COSTA SANTOS *et al.* (2014) avaliaram o tempo para exaustão, os níveis séricos de CK, proteína c-reativa e o infiltrado inflamatório no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a protocolo de natação. O protocolo de exercício foi dividido em duas etapas: a primeira com 45 minutos de natação; e a segunda até a exaustão dos animais. Durante o intervalo (25 min) entre cada etapa, foi utilizada ou a LEDT (940 nm) ou a crioterapia (10 min, 10 °C) ou a recuperação passiva (sem nenhuma terapia) para a recuperação dos animais. Os resultados mostraram que os grupos crioterapia e LEDT aumentaram o tempo para a exaustão na segunda etapa do protocolo quando comparados ao grupo recuperação passiva, mas sem diferenças significativas entre os grupos LEDT e crioterapia. Todos os grupos submetidos ao protocolo de exercício aumentaram a contagem de neutrófilos no músculo gastrocnêmio. Os grupos crioterapia e recuperação passiva apresentaram leucocitose quando comparados aos grupos controle e LEDT. Também, os grupos crioterapia, recuperação passiva e o grupo LEDT tiveram os mesmos níveis de CK sanguíneo, mas apenas o grupo LEDT diminuiu significativamente os níveis de proteína c-reativa comparado ao grupo crioterapia após 24h do exercício.

Abaixo, a tabela 1 traz todos os parâmetros da fototerapia (disponibilizados nos estudos), grupo muscular irradiado, tipo de exercício realizado e o modo de aplicação utilizada nos estudos experimentais:

Tabela 1**Fototerapia por LLLT e LEDT no desempenho muscular: modelos experimentais**

Referência	Parâmetros da LLLT / LEDT	Músculo / Exercício	Modo de aplicação
LOPES-MARTINS <i>et al.</i> (2006)	Laser 655 nm Área do diodo 0,08 cm ² ; 2,5 mW; 31,25 mW/cm ² Grupos: 0,5 J/cm ² (32 segundos) 1 J/cm ² (80 segundos) 2,5 J/cm ² (160 segundos) 1 ponto de aplicação	Tibial anterior Exercício: estimulação elétrica neuromuscular	Contato Antes do exercício
LIU <i>et al.</i> (2009)	Laser 632 nm Área do diodo 0,2 cm ² Grupos: 12 J/cm ² , 4 mW, 20 mW/cm ² , 10 minutos 28 J/cm ² ; 9 mW, 46 mW/cm ² , 10 minutos 43 J/cm ² ; 14 mW, 71 mW/cm ² , 10 minutos 1 ponto de aplicação	Gastrocnêmio Exercício: esteira em plano declinado	Contato Após o exercício
LEAL JUNIOR <i>et al.</i> (2010a)	Laser 904 nm Área do diodo 0,2 cm ² ; 15 mW, 75 mW/cm ² Grupos: 0,1 J (7 segundos) 0,3 J (20 segundos) 1 J (67 segundos) 3 J (200 segundos) 1 ponto de aplicação	Tibial anterior Exercício: estimulação elétrica neuromuscular	Contato Antes do exercício
SUSSAI <i>et al.</i> (2010)	Laser 660 nm Área do diodo 0,03 cm ² ; 100 mW; 3,3 mW/cm ² 4 J por diodo (40 segundos); 133,3 J/cm ² 1 ponto de aplicação	Gastrocnêmio Exercício: natação com carga	Contato Após o exercício

DE ALMEIDA <i>et al.</i> (2011)	<p>Laser 904 nm Área do diodo 0,2 cm²; 15 mW; 75mW/cm² Grupos: 0,1 J (7 segundos) 0,3 J (20 segundos) 1 J (67 segundos) 3 J (200 segundos) 1 ponto de aplicação</p>	<p>Tibial anterior</p> <p>Exercício: estimulação elétrica neuromuscular</p>	<p>Contato</p> <p>Antes do exercício</p>
PATROCINIO <i>et al.</i> (2013)	<p>Laser 808 nm Área do diodo 0,028 cm²; 100 mW; 3.571 mW/cm² 3,3 J por ponto (33 segundos), 120 J/cm² 1 ponto de aplicação</p>	<p>Tibial Anterior</p> <p>Exercício: escada</p>	<p>Contato</p> <p>Após o exercício</p>
SANTOS <i>et al.</i> (2014)	<p>Lasers 660 nm, 830 nm e 905 nm Área do diodo de 0,028 cm²; 50 mW; 1.785 mW/cm² Grupos: 660 nm – 1 J (20 seg); 3 J (60 seg) e 10 J (200 seg) 830 nm – 1 J (20 seg); 3 J (60 seg) e 10 J (200 seg) 905 nm – 1 J (20 seg); 3 J (60 seg) e 10 J (200 seg) 1 ponto de aplicação</p>	<p>Tibial anterior</p> <p>Exercício: estimulação elétrica neuromuscular</p>	<p>Contato</p> <p>Antes do exercício</p>
ALBUQUERQUE-PONTES <i>et al.</i> (2014)	<p>Lasers 660 nm; 830 nm e 905 nm Área dos diodos: 0,028 cm²; 50 mW; 1.785 mW/cm² Grupos: 660 nm – 1 J (20 seg); 3 J (60 seg) e 10 J (200 seg) 830 nm – 1 J (20 seg); 3 J (60 seg) e 10 J (200 seg) 905 nm – 1 J (20 seg); 3 J (60 seg) e 10 J (200 seg) 1 ponto de aplicação</p>	<p>Tibial anterior</p> <p>Atividade da citocromo c oxidase</p>	<p>Contato</p>
CAMARGO <i>et al.</i> (2012)	<p>LED 940 nm Área do diodo calculada 17,4 cm²; 160 mW; 9,5 mW/cm² Grupos: LED – 69,6 J (7 min 15 seg), 4 J/cm² Crioterapia – 10 min a 10°C 1 ponto de aplicação</p>	<p>Porção media do tríceps sural</p> <p>Exercício: natação durante 100 minutos</p>	<p>Sem contato (1 cm de distância)</p> <p>Após o exercício</p>

CORAZZA <i>et al.</i> (2013)	LED 850 nm Área do diodo 0,5 cm ² ; 100 mW, 200 mW/cm ² 60 J por ponto (10 minutos), 120 J/cm ²	Trocânter maior e reto femoral	Contato
	2 pontos de aplicação: 120 J	Exercício: salto com carga em recipiente com água	Após o exercício
DA COSTA SANTOS <i>et al.</i> (2014)	LED 940 nm Área do diodo calculada 17,4 cm ² ; 160 mW; 9,5 mW/cm ² Grupos: LED – 69,6 J (7 min 15 seg), 4J/cm ² Crioterapia – 10 min a 10°C	Porção media do tríceps sural	Sem contato (1 cm de distância)
	1 ponto de aplicação	Exercício: natação durante 45 min + recuperação (25 min) + natação até exaustão	No intervalo de recuperação

2.3 Trabalhos clínicos que utilizaram a LLLT e/ou a LEDT

Da mesma maneira que foi realizada a revisão bibliográfica sobre fototerapia e desempenho muscular em modelos experimentais, foi conduzida uma revisão bibliográfica para trabalhos clínicos. A pesquisa utilizou os bancos de dados *PubMed* e *MEDLINE* entre o período de 1/6/1994 a 1/7/2014. Foram excluídos todos os trabalhos com propostas diferentes da melhora do desempenho, recuperação e/ou prevenção de dano muscular frente ao exercício físico. Os termos usados na pesquisa foram: *low-level laser therapy (LLLT)*, *light-emitting diode (LED)*, *LED therapy (LEDT)*, *muscle performance*, *fatigue*, *training*, *exercise*, *muscle damage*. Foram classificados 26 estudos clínicos.

2.3.1 Trabalhos clínicos que utilizaram a LLLT: respostas agudas

A grande maioria dos trabalhos envolvendo a fototerapia por LLLT e exercícios físicos em humanos buscaram os efeitos agudos dessa terapia sobre o desempenho muscular em exercícios de alta intensidade.

Um dos primeiros estudos clínicos publicados foi o estudo piloto de GORGEY; WADEE e SOBHI (2008). Os autores aplicaram a LLLT (808 nm) durante 5 minutos (3 J – baixa energia) e 10 minutos (7 J – alta energia) sobre o quadríceps femoral antes da indução de fadiga por estimulação elétrica neuromuscular. Os resultados mostraram que os grupos irradiados tiveram menor percentual de fadiga muscular comparado ao grupo controle, mas sem significância estatística. Também não houve diferença significativa entre os grupos tratados com LLLT.

Com metodologias muito similares, Leal Junior *et al.*, (LEAL JUNIOR *et al.*, 2008; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009d; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b) e DE ALMEIDA *et*

al. (2012) investigaram os efeitos da LLLT sobre o desempenho do músculo bíceps braquial em estudos duplo-cego e controlado por placebo.

LEAL JUNIOR *et al.* (2008) verificaram os efeitos da LLLT (655 nm) aplicada sobre o bíceps braquial antes de exercício em banco *scott*. O exercício foi realizado com 75% da carga referente a contração voluntária máxima (CVM) até a exaustão. Foram irradiados 4 pontos do bíceps braquial durante 100 segundos sobre cada ponto. Os resultados mostraram aumento significativo do número de repetições do grupo irradiado comparado ao placebo. Porém, não houve aumento do tempo de contração e/ou diminuição dos níveis de lactato sanguíneo.

Com o mesmo desenho experimental, esses mesmos autores utilizaram outra LLLT (830 nm) aplicada em 4 pontos do bíceps braquial (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009d). O tempo de irradiação foi de 50 segundos em cada ponto antes de iniciar o exercício em banco *scott*. Os resultados foram os mesmos encontrados anteriormente: a LLLT aumentou o número de repetições comparado ao grupo placebo.

Nessa mesma perspectiva, DE ALMEIDA *et al.* (2012) buscaram identificar em um único estudo qual comprimento de onda poderia ser melhor para aumentar o desempenho do bíceps braquial em exercícios de alta intensidade. A LLLT (660 nm ou 830 nm) foi aplicada sobre 4 pontos do bíceps braquial, durante de 100 segundos sobre cada ponto antes de iniciar o exercício em banco *scott*. Os grupos irradiados com LLLT (660 nm ou 830 nm) tiveram maior força e pico de torque comparado ao grupo placebo. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos irradiados.

LEAL JUNIOR *et al.* (2010b) também desenvolveram outro estudo duplo-cego controlado por placebo, randomizado e cruzado para investigar a fadiga do bíceps braquial. Nesse estudo, a LLLT (arranjo com 5 diodos laser de 810 nm) foi aplicada antes do exercício em banco *scott* com 75% da CVM até a exaustão. Foram irradiados

dois pontos do bíceps braquial durante 30 segundos sobre cada ponto. Os resultados mostraram que a LLLT aumentou o número de repetições e o tempo de contração, diminuiu os níveis de lactato, CK e proteína c-reativa após o exercício.

No entanto, recentemente HIGASHI *et al.* (2013) buscaram identificar os mesmos efeitos positivos da LLLT na redução da fadiga muscular em bíceps braquial. Os autores posicionaram as voluntárias sentadas e irradiaram o bíceps braquial com LLLT (808 nm) ou placebo antes do exercício em estudo randomizado e cruzado. Por meio de eletromiografia de superfície, níveis de lactato sanguíneo e número de repetições máximas com carga de 75% referente a 1 repetição máxima (1RM), os autores não encontraram nenhuma diferença significativa entre os grupos, contrariando resultados prévios da literatura.

Além do bíceps braquial, outros músculos também foram investigados quanto aos efeitos da fototerapia para reduzir o dano e a fadiga muscular. O músculo reto femoral de atletas de voleibol e futebol foi previamente irradiado com a fototerapia por LLLT (830 nm) em estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo. Apesar de não aumentar o desempenho muscular no teste de Wingate, o grupo LLLT não aumentou significativamente os níveis de CK, e os níveis de lactato sanguíneo diminuíram após 15 minutos do término do teste de Wingate (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009b).

BARONI *et al.* (2010a) investigaram os efeitos da LLLT (arranjo com 5 diodos laser de 810 nm) sobre o metabolismo energético, dano muscular e a dor de início tardio em homens jovens após 5 séries de 15 contrações excêntricas do quadríceps femoral em dinamômetro isocinético. Foram 6 pontos de irradiação sobre o quadríceps femoral com duração de 30 segundos sobre cada ponto. Os resultados mostraram que a LLLT aplicada antes do exercício proporcionou menor aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) 48h após o exercício, menor aumento de CK sanguínea 24h e 48h

após o exercício e menor perda da contração voluntária máxima (CVM) imediatamente e 24h após o exercício. No entanto, a dor de início tardio mensurada pela escala visual analógica (EVA) foi igual para os grupos LLLT e placebo.

Utilizando um modelo de investigação da fadiga muscular por eletromiografia de superfície e número de repetições máximas, TOMA *et al.* (2013) utilizaram a LLLT (808 nm) ou placebo para irradiar o músculo reto femoral de mulheres idosas previamente ao exercício de flexão-extensão do joelho durante 60 segundos com carga referente a 75% da 1RM em cadeira extensora em estudo triplo-cego e controlado por placebo. Houve um aumento no número de repetições máximas no grupo LLLT comparado ao placebo. Mas não houve redução significativa da fadiga do reto femoral na análise de eletromiografia de superfície.

Nessa mesma perspectiva, DOS SANTOS MACIEL *et al.* (2014) testaram se a fototerapia por LLLT (780 nm) poderia aumentar o desempenho do músculo tibial anterior quando aplicada previamente ao teste de força e fadiga em dinamômetro isocinético associado à eletromiografia de superfície em estudo duplo-cego e controlado por placebo. Os autores verificaram que a LLLT aumentou o torque muscular sem diferenças significativas entre os grupos; a LLLT não reduziu a fadiga muscular analisada por eletromiografia de superfície, concordando com o estudo prévio de TOMA *et al.* (2013); e não reduziu os níveis de lactato sanguíneo de forma significativa entre os grupos.

Buscando identificar mais efeitos agudos da LLLT sobre o desempenho muscular, DE MARCHI *et al.* (2012) utilizam a LLLT (arranjo com 5 diodos laser de 810 nm) para reduzir a fadiga, estresse oxidativo e o dano muscular em exercício físico de alta intensidade em esteira ergométrica. Foram irradiados seis pontos do quadríceps femoral como realizado por BARONI *et al.* (2010a), 4 pontos sobre os isquiotibiais e

dois pontos sobre o gastrocnêmio antes do exercício progressivo em esteira realizado até a exaustão. O tempo de irradiação de cada ponto foi de 30 segundos. Os resultados evidenciaram que o grupo irradiado aumentou o consumo máximo de oxigênio absoluto, relativo e o tempo de exercício comparado ao placebo. A atividade da enzima LDH, o dano muscular (CK) e a peroxidação lipídica (TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foram todos significativamente maiores apenas no grupo placebo após o exercício. A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi diminuída também apenas no grupo placebo após o exercício.

Com modificações do momento do uso da fototerapia para a redução da fadiga e dano muscular, FELISMINO *et al.* (2014) aplicaram a LLLT (808 nm) entre as séries de exercício físico. Esse estudo duplo-cego e controlado por placebo induziu a fadiga e o dano muscular em homens jovens por meio de 10 séries de 10 repetições de flexão-extensão do cotovelo (banco *scott*) com carga de 50% da 1RM. Os resultados mostraram que a LLLT reduziu significativamente os níveis de CK sanguíneo 72h após o teste, comparado ao grupo placebo. Mas não houve diferença no desempenho muscular entre os grupos.

Com o mesmo raciocínio anterior, DOS REIS *et al.* (2014) testaram a efetividade da LLLT (830 nm) quando aplicada sobre todo o quadríceps femoral antes ou após o exercício físico em cadeira extensora com 75% da 1RM em estudo duplo-cego e controlado por placebo. Os autores verificaram que não houve diferença significativa no número de repetições máximas realizadas entre os grupos, mas os níveis de lactato e CK foram menores no grupo que recebeu a fototerapia após o exercício físico comparado aos grupos placebo e LLLT aplicada antes do exercício físico.

Por fim, ANTONIALLI *et al.* (2014) utilizou um arranjo composto de laser e LEDs sobre a recuperação muscular pós-indução de fadiga em dinamômetro isocinético

utilizando contrações excêntricas e contrações voluntárias máximas em exercício isométrico a 60° de flexão do joelho. Os autores aplicaram a fototerapia (laser e LEDs) sobre 6 pontos do quadríceps femoral 3 minutos antes do início do protocolo de exercício excêntrico. Comparado à terapia placebo, foram testadas 3 doses de luz por ponto de aplicação: 10 J, 30 J e 50 J. Avaliações de lactato sanguíneo, dor muscular de início tardio, CK e contrações voluntárias máximas foram realizadas imediatamente após a indução de fadiga, bem como após 1h, 24h, 48h, 72h e 96h. Os resultados mostraram que as doses de 10 J e 30 J aumentaram o pico de torque da contração voluntária máxima imediatamente após até 96h. A dor foi reduzida com as doses de 30 J e 50 J comparados ao placebo. E a CK foi significativamente diminuída com as três doses.

2.3.2 Trabalhos clínicos que utilizaram a LLLT: respostas crônicas

FERRARESI *et al.* (2011) e VIEIRA *et al.* (2012) verificaram os efeitos da LLLT sobre programas de treinamento físico de força e de resistência em estudos clínicos randomizados e controlados. FERRARESI *et al.* (2011) verificaram os efeitos da LLLT (arranjo com 6 diodos laser de 808 nm) sobre um programa de treinamento físico com carga de 80% referente a 1RM. O programa de treinamento foi realizado duas vezes por semana, durante 12 semanas consecutivas e a LLLT foi aplicada imediatamente após cada sessão de treinamento. Foram irradiadas 7 regiões do quadríceps femoral durante 10 segundos por região. Os resultados mostraram que o grupo LLLT teve maior ganho percentual na 1RM comparado ao grupo treinado sem LLLT e ao grupo controle após o programa de treinamento. Apenas o grupo LLLT aumentou significativamente a média

de pico de torque e o pico de torque dos músculos extensores do joelho em dinamometria isocinética.

O segundo trabalho foi elaborado por VIEIRA *et al.* (2012). Nesse estudo, verificou-se os efeitos da LLLT (arranjo com 6 diodos laser de 808 nm) sobre um programa de treinamento físico de intensidade moderada (referente ao limiar anaeróbio ventilatório) em bicicleta ergométrica. O programa de treinamento físico foi realizado três vezes por semana durante 9 semanas consecutivas. A LLLT foi aplicada sobre 5 regiões do quadríceps femoral durante 10 segundos por região. Os resultados mostraram que apenas o grupo LLLT diminuiu o índice de fadiga dos músculos extensores do joelho em dinamometria isocinética.

2.3.3 Trabalhos clínicos que utilizaram a LEDT: respostas agudas

Recentemente a LEDT começou a ser investigada com o mesmo propósito anterior da LLLT: aumentar o desempenho muscular humano, recuperar e/ou prevenir lesões oriundas de exercícios físicos de alta intensidade. Alguns dos principais supostos motivos para essa investigação é que os LEDs são fontes emissoras de luz mais acessíveis (menor valor) e possuem uma maior área emissora de luz comparada aos diodos laser, tratando, assim, maiores áreas ponto a ponto.

O primeiro estudo nessa linha de pesquisa foi conduzido por VINCK *et al.* (2006). Os autores investigaram os efeitos da LEDT (arranjo de 32 LEDs, 950 nm) sobre a dor muscular de início tardio (DMIT) após a indução de fadiga muscular do bíceps braquial em dinamômetro isocinético. Os autores não encontraram diferenças significativas entre os grupos LEDT e placebo para o pico de torque e o nível de dor aferida por algômetro e escala visual analógica (EVA).

Utilizando metodologia semelhante, DOURIS *et al.* (2006) verificaram que a LEDT (arranjo de 36 LEDs, 880 nm e 660 nm) diminuiu significativamente a DMIT induzida no bíceps braquial utilizando pesos livres, comparada aos grupos placebo e controle. Essa diminuição ocorreu após 48h da indução da DMIT e foi identificada por meio da EVA e do questionário *McGill* para dor.

Além da inibição de dor muscular induzida por exercício, a LEDT também foi empregada para a redução da fadiga muscular (KELENCZ *et al.*, 2010). Em seu estudo clínico, KELENCZ *et al.* (2010) verificaram os efeitos da dose-resposta da LEDT (640 nm) sobre a atividade muscular do masseter. Os autores concluíram que para a redução da fadiga muscular, a energia de 2,08 J por ponto (total de 8 pontos) aumentou o tempo de exercício máximo (oclusão bucal) para o surgimento da fadiga comparado aos grupos 1,04 J por ponto (total de 8 pontos) e 3,13 J por ponto (total de 8 pontos).

Mais recentemente, LEAL JUNIOR *et al.* (2009c) aplicaram a LEDT (arranjo com 69 LEDs, 850 nm e 660 nm) durante 30 segundos de irradiação sobre um único ponto no ventre do músculo bíceps braquial antes do exercício com 75% da CVM em banco *scott*. O grupo LEDT aumentou o número de repetições e o tempo de contração no exercício proposto. Também diminuiu os níveis sanguíneos de CK, lactato e proteína c-reativa após o exercício comparado ao grupo placebo.

Nessa mesma perspectiva, BARONI *et al.* (2010b) também utilizou o mesmo arranjo multidiodo do estudo anterior, mas avaliando a fadiga do quadríceps femoral em dinamômetro isocinético. A LEDT foi aplicada sobre 3 pontos do quadríceps femoral. O tempo de irradiação foi de 30 segundos sobre cada ponto e os resultados mostraram que a LEDT foi eficiente para diminuir o decaimento de torque extensor do joelho.

Ao contrário dos autores anteriores, BORGES *et al.* (2014) utilizaram a LEDT (630 nm) imediatamente após a indução de dano muscular no bíceps braquial por meio

de exercício excêntrico. Comparado ao grupo placebo, o grupo LED diminuiu a dor na EVA, teve menor decaimento de força isométrica e menor diminuição ou restrição no arco de movimento de flexão-extensão do cotovelo após 24h, 48h, 72h e 96h da indução do dano muscular. Os autores concluíram que a LEDT foi efetiva em atenuar os efeitos deletérios do dano muscular induzido por exercício excêntrico.

Apesar dos bons resultados obtidos previamente nos estudos supracitados, DENIS; O'BRIEN e DELAHUNT (2013), em estudo uni cego, randomizado, cruzado e controlado por placebo, não encontraram diferenças significativas na potência pico em teste de Wingate, índice de fadiga e concentração sanguínea de lactato. Os autores utilizaram um arranjo de LEDs para a LEDT (arranjo com 69 LEDs, 950 nm e 660 nm) no intervalo entre o 2º e o 3º teste de Wingate.

A fim de comparar os efeitos da LEDT e LLLT, LEAL JUNIOR *et al.* (2009a) investigaram o desempenho físico de jogadores de voleibol tratados ou com arranjo de 69 LEDs (35 LEDs de 850 nm e 34 LEDs de 660 nm) ou LLLT com único diodo (810 nm). Foram realizados três testes de esforço de alta intensidade (teste de Wingate) em dias não consecutivos. A LEDT (cluter com 69 LEDs) ou a LLLT ou placebo foram aplicados antes do início do exercício sobre dois pontos no ventre do músculo reto femoral, com tempo de irradiação de 30 segundos sobre cada ponto. Houve diminuição significativa dos níveis sanguíneos de CK do grupo LEDT após o exercício, comparado ao grupo LLLT e placebo. No entanto, não houve aumento do desempenho físico ou redução significativa nos níveis de lactato do grupo LEDT comparado aos demais grupos.

Ainda nessa mesma perspectiva de comparação, LEAL JUNIOR *et al.* (2011) compararam os efeitos da LEDT (arranjo com 69 LEDs, 850 nm e 660 nm) à criomersão na recuperação muscular de 6 atletas em estudo duplo-cego, randomizado,

cruzado e controlado por placebo. Os atletas realizaram três testes de Wingate em três dias distintos. Após cada teste, os voluntários receberam ou placebo LEDT, ou LEDT ou crioterapia (5 minutos a 5 °C). A LEDT foi aplicada sobre dois pontos do quadríceps femoral, dois pontos sobre os isquiotibiais e dois pontos sobre o gastrocnêmio. A LEDT não aumentou o trabalho muscular no teste de Wingate e não modulou a proteína c-reativa, mas diminuiu significativamente os níveis sanguíneos de CK e lactato.

2.3.4 Trabalhos clínicos que utilizaram a LEDT: respostas crônicas

PAOLILLO *et al.* (2011) investigaram os efeitos da terapia por LED em mulheres na pós-menopausa submetidas a treinamento físico em esteira ergométrica durante 12 semanas. Foram duas sessões de treinos semanais e cada sessão teve duração de 30 minutos. Durante todas as sessões de treinamento, o grupo LED recebeu a LEDT (850 nm) por meio de 2 placas de LEDs, com raio de curvatura de 57 cm e posicionadas aproximadamente à 15 centímetros de distância da coxa das voluntárias. Os autores concluíram que o grupo LED aumentou a potência e o trabalho dos músculos extensores do joelho em dinamometria isocinética comparado ao grupo treinamento sem LED (controle), o qual teve maior índice de fadiga.

Ainda considerando o trabalho supracitado, PAOLILLO *et al.* (2013) mostraram que o treinamento físico em esteira associado à LEDT (850 nm) durante 6 meses diminuiu o tempo de recuperação para a frequência cardíaca e o duplo produto após teste modificado de Bruce em esteira ergométrica. Ambos os grupos (LED e treinamento sem LED) aumentaram a tolerância ao exercício (tempo limite para exaustão), o equivalente

metabólico (MET) e o desempenho no teste modificado de Bruce sem diferenças significativas entre eles.

Abaixo, a tabela 2 traz todos os parâmetros da fototerapia (disponibilizados nos estudos), grupo muscular irradiado, tipo de exercício realizado e o modo de aplicação utilizado nos estudos clínicos:

Tabela 2

Fototerapia por LLLT e LEDT no desempenho muscular: estudos clínicos

Referência	Parâmetros da LLLT / LEDT	Músculo / exercício	Modo de aplicação
GORGEY; WADEE e SOBHI (2008)	Arranjo com 4 lasers 808 nm; 500 mW; 8,3 mW/cm ² Grupos: 7 J (10 minutos) 3 J (5 minutos) 1 ponto de aplicação	Quadríceps femoral Exercício: dinamômetro isocinético	Escaneamento Antes do exercício
LEAL JUNIOR <i>et al.</i> (2008)	Laser 655 nm; Área do diodo 0,1 cm ² ; 50 mW; 500 J/cm ² ; 5 W/cm ² ; 5 J por diodo (100 segundos); 4 pontos de aplicação: 20 J	Bíceps braquial Exercício: banco <i>scott</i>	Contato Antes do exercício
LEAL JUNIOR <i>et al.</i> (2009b)	Laser 830 nm; Área do diodo 0,0028 cm ² ; 100 mW; Grupos: Atletas de voleibol – 4 J (40 seg) ; 1.428,57 J/cm ² Atletas de futebol – 3 J (30 seg); 1.071,43 J/cm ² ; 10 pontos de aplicação: 40 J (atletas de voleibol) 30 J (atletas de futebol)	Reto femoral Exercício: Wingate	Contato Antes do exercício
LEAL JUNIOR <i>et al.</i> (2009d)	Laser 830 nm; Área do diodo 0,0028 cm ² ; 100 mW; 35,7 W/cm ² 5 J (50 segundos), 1.785 J/cm ² 4 pontos de aplicação: 20 J	Bíceps braquial Exercício: banco <i>scott</i>	Contato Antes do exercício
BARONI <i>et al.</i> (2010a)	Arranjo com 5 lasers 810 nm; Área do diodo 0,029 cm ² ; 200 mW; 6,89 W/cm ² 6 J por diodo (30 segundos); 206,89 J/cm ² ; 30 J por ponto de aplicação: 5 x 6 J 6 pontos de aplicação: 180 J	Quadríceps femoral: 2 sobre o vasto medial, 2 sobre o vasto lateral, 2 sobre o reto femoral Exercício: dinamômetro isocinético	Contato Antes do exercício

LEAL JUNIOR <i>et al.</i> (2010b)	Arranjo com 5 lasers 810 nm; Área do diodo 0,0364 cm ² ; 200 mW; 5,495 W/cm ² 6 J por diodo (30 segundos), 164,85 J/cm ² ; 30 J por ponto de aplicação: 5 x 6 J 2 pontos de aplicação: 60 J	Bíceps braquial Exercício: banco <i>scott</i>	Contato Antes do exercício
DE ALMEIDA <i>et al.</i> (2012)	Laser 660 nm; Área 0,0028 cm ² ; 50 mW; 17,85 W/cm ² ; 5 J (100 segundos), 1.785 J/cm ² ; 4 pontos de aplicação: 20 J <i>versus</i> Laser 830 nm Área 0,0028 cm ² ; 50 mW; 17,85W/cm ² ; 5 J (100 segundos), 1.785 J/cm ² ; 4 pontos de aplicação: 20 J	Bíceps braquial Exercício: CVM por 60 segundos	Contato Antes do exercício
DE MARCHI <i>et al.</i> (2012)	Arranjo com 5 lasers 810 nm; Área de cada diodo 0,0364 cm ² ; 200 mW; 5,495 W/cm ² 6 J por diodo (30 segundos), 164,85 J/cm ² 30 J por ponto de aplicação: 5 x 6 J 12 pontos de aplicação: 360 J	Quadríceps femoral: 2 pontos sobre o reto femoral, 2 sobre o vasto medial, 2 sobre o vasto lateral. Isquiotibiais: 4 pontos Gastrocnêmio: 2 pontos Exercício: corrida em esteira até exaustão	Contato Antes do exercício
HIGASHI <i>et al.</i> (2013)	Laser 808 nm; Área do diodo 0,0028 cm ² ; 100 mW; 35,7 W/cm ² 7 J (70 segundos), 2.500 J/cm ² 8 pontos de aplicação: 56 J	Bíceps braquial Exercício: rosca bíceps	Contato Antes do exercício
TOMA <i>et al.</i> (2013)	Laser 808 nm; Área do diodo 0,0078 cm ² ; 100 mW; 12,7 W/cm ² 7 J (70 segundos), 892 J/cm ²	Bíceps braquial Exercício: cadeira	Contato Antes do exercício

	8 pontos de aplicação: 56 J	extensora	
DOS SANTOS MACIEL <i>et al.</i> (2014)	Laser 780 nm; Área 0,2 cm ² ; 30 mW; 0,15 W/cm ² 0,81 J (27 segundos), 4 J/cm ² 29 pontos de aplicação: 23,49 J	Tibial anterior	Contato
		Exercício: dinamômetro isocinético	Antes do exercício
FELISMINO <i>et al.</i> (2014)	Laser 808 nm; Área 0,0028 cm ² ; 100 mW; 35,71 W/cm ² 1 J (10 segundos), 357,14 J/cm ² 4 pontos de aplicação: 4 J	Bíceps braquial	Contato
		Exercício: banco <i>scott</i>	Entre as séries de exercício
DOS REIS <i>et al.</i> (2014)	Arranjo com 6 lasers 830 nm; Área 0,0028cm ² ; 60 mW; 21,42W/cm ² 0,6 J por diodo (10 segundos), 214,28 J/cm ² 3,6 J por região de aplicação: 0,6 J x 6 7 regiões de 3,6 J cada: 25,2 J	Quadríceps femoral: 7 regiões distribuídas uniformemente sobre o quadríceps femoral	Contato
		Exercício: mesa extensora	Antes ou após do exercício
(ANTONIALLI <i>et al.</i> , 2014)	Arranjo de 1 laser 905 nm, 4 LEDs 875 nm e 4 LEDs 640 nm; Área do diodo laser 0,44 cm ² ; 0,3125 mW; 0,07 mW/cm ² ; Área do LED 875 nm: 0,9 cm ² ; 17,5 mW; 19,44 mW/cm ² ; Área do LED 640 nm: 0,9 cm ² ; 15 mW; 16,66 mW/cm ² ; 10 J por região de aplicação: 76 segundos 30 J por região de aplicação: 228 segundos 50 J por região de aplicação: 381 segundos 6 regiões de aplicação: 60 J; 180 J; 300 J	Quadríceps femoral: 2 regiões sobre o vasto medial, 2 sobre o vasto lateral e 2 sobre o reto femoral	Contato
		Exercício: contrações excêntricas em dinamômetro isocinético	Antes do exercício
FERRARESI <i>et al.</i> (2011)	Arranjo com 6 lasers 808 nm; Área 0,0028cm ² ; 60 mW; 21,42W/cm ² 0,6 J por diodo (10 segundos), 214,28 J/cm ² 3,6 J por região de aplicação: 0,6 J x 6 7 regiões de 3,6 J cada: 25,2 J	Quadríceps femoral: 7 regiões distribuídas uniformemente sobre o quadríceps femoral	Contato
		Exercício: <i>leg press</i> e dinamômetro isocinético	Após o exercício

VIEIRA <i>et al.</i> (2012)	Arranjo com 6 lasers 808 nm; Área 0,0028cm ² ; 60 mW; 21,42W/cm ² 0,6 J por diodo (10 segundos), 214,28 J/cm ² 3,6 J por região de aplicação: 0,6 J x 6 5 regiões de 3,6 J cada: 18 J	Quadríceps femoral: 5 regiões distribuídas uniformemente sobre o quadríceps femoral	Contato Após o exercício
VINCK <i>et al.</i> (2006)	Arranjo com 32 LEDs de 950 nm; Área do arranjo 18 cm ² ; 160 mW; 3,2 J/cm ² (360 segundos) 1 ponto de aplicação	Bíceps braquial	Contato Após o exercício
DOURIS <i>et al.</i> (2006)	Arranjo com 36 LEDs: Área do arranjo 5 cm ² ; 100 mW/cm ² 32 LEDs 880 nm; 80 segundos, 8 J/cm ² 4 LEDs 660 nm; 80 segundos, 8 J/cm ² 2 pontos de aplicação	Bíceps braquial: 1 ponto junção musculotendínea e 1 ponto 5 cm acima	Contato Após o exercício
KELENCZ <i>et al.</i> (2010)	LED 640 nm Área do LED de 0,522 cm ² ; 116 mW; 222 mW/cm ² Grupos: 1,04 J (9 segundos); 8 pontos (8,35 J); 2 J/cm ² 2,08 J (18 segundos); 8 pontos (16,7 J); 4 J/cm ² 3,13 J (27 segundos); 8 pontos (25 J); 6 J/cm ² 8 pontos de aplicação	Masseter	Contato Antes do exercício
LEAL JUNIOR <i>et al.</i> (2009c)	Arranjo com 69 LEDs: Área de cada LED 0,2 cm ² mW; 150 mW/cm ² ; 0,3 J LED 660 nm (30 segundos), 1,5 J/cm ² 0,9 J LED 850 nm (30 segundos), 4,5 J/cm ² 41,7 J por ponto de aplicação (30 segundos) 1 ponto de aplicação	Bíceps braquial	Contato Antes do exercício
BARONI <i>et al.</i> (2010b)	Arranjo com 69 LEDs: Área de cada LED 0,2 cm ² ; 34 LEDs 660 nm; 10 mW; 50 mW/cm ² 35 LEDs 850 nm; 30 mW; 150 mW/cm ² ;	Quadríceps femoral: 2 pontos sobre o reto femoral, 2 sobre o vasto medial, 2 sobre o vasto	Contato

	0,3 J LED 660 nm (30 segundos), 1,5 J/cm ² 0,9 J LED 850 nm (30 segundos), 4,5 J/cm ² 41,7 J por ponto de aplicação (30 segundos)	lateral.	Antes do exercício
	3 pontos de aplicação: 125,1 J	Exercício: dinamômetro isocinético	
BORGES <i>et al.</i> (2014)	LED 630 nm Área do LED de 1,77 cm ² ; 300 mW; 169,49 mW/cm ²	Bíceps braquial	Contato
	9 J (30 segundos); 5,1 J/cm ² ; 4 pontos de aplicação: 36 J	Exercício: excêntrico	Antes do exercício
LEAL JUNIOR <i>et al.</i> (2009a)	Laser 810 nm Área do diodo 0,036 cm ² ; 200 mW; 5,5 W/cm ² ; 6 J (30 segundos), 164,84 J/cm ² 2 pontos de aplicação: 12 J <i>versus</i> Arranjo com 69 LEDs: Área de cada LED 0,2 cm ² ; 34 LEDs 660 nm; 10 mW; 50 mW/cm ² 35 LEDs 850 nm; 30 mW; 150 mW/cm ² ; 0,3 J LED 660 nm (30 segundos), 1,5 J/cm ² 0,9 J LED 850 nm (30 segundos), 4,5 J/cm ² 41,7 J por ponto de aplicação 2 pontos de aplicação: 83,4 J	Reto femoral	Contato
		Exercício: Wingate	Antes do exercício
LEAL JUNIOR <i>et al.</i> (2011)	Arranjo com 69 LEDs: Área de cada LED 0,2 cm ² ; 34 LEDs 660 nm; 10 mW; 50 mW/cm ² 35 LEDs 850 nm; 30 mW; 150 mW/cm ² ; 0,3 J LED 660 nm (30 segundos), 1,5 J/cm ² 0,9 J LED 850 nm (30 segundos), 4,5 J/cm ² 41,7 J por ponto de aplicação 5 pontos de aplicação: 208,5 J <i>Versus</i>	Quadríceps femoral: 2 pontos; Isquiotibiais: 2 pontos; Gastrocnêmio: 1 ponto	Contato

	Crioterapia Imersão por 5 minutos (5 ° C)	Exercício: 3 Wingates	Após o exercício
DENIS; O'BRIEN e DELAHUNT (2013)	<p>Arranjo com 69 LEDs: Área de cada LED 0,2 cm²; 34 LEDs 660 nm; 10 mW; 50 mW/cm² 35 LEDs 950 nm; 15 mW; 75 mW/cm²;</p> <p>0,30 J LED 660 nm (30 segundos), 1,5 J/cm² 0,45 J LED 950 nm (30 segundos), 2,25 J/cm² 25,95 J por ponto de aplicação</p>	<p>Quadríceps femoral: 2 pontos sobre o reto femoral, 1 ponto sobre vasto medial, 1 ponto sobre vasto lateral</p>	<p>Contato</p>
PAOLILLO <i>et al.</i> (2011)	<p>4 pontos de aplicação: 103,8 J</p> <p>2 Placas de 2.000 LEDs (850 nm) cada: Área de cada placa 1.110 cm² Raio de curvatura de 57 cm 2.000 LEDs 850 nm; 31 mW/cm² 14.400 J (ambos os membros); 30 minutos; 55,8 J/cm²</p>	<p>Exercício: Wingate</p> <p>Toda a coxa</p>	<p>Intervalo entre 2° e o 3° Wingate</p> <p>À distância</p>
PAOLILLO <i>et al.</i> (2013)	<p>2 Placas de 2.000 LEDs (850 nm) cada: Área de cada placa 1.110 cm² Raio de curvatura de 57 cm 2.000 LEDs 850 nm; 100 mW; 39 mW/cm² 45 minutos; 108 J/cm²</p>	<p>Exercício: esteira ergométrica</p> <p>Toda a coxa</p>	<p>Durante o exercício</p> <p>À distância</p>
		<p>Exercício: esteira ergométrica</p>	<p>Durante o exercício</p>

2.4 Parâmetros da fototerapia (LLLT e/ou LEDT) empregados nos estudos

A fototerapia por LLLT e LEDT tem sido utilizada de maneiras distintas entre os pesquisadores. Essas diferenças concentram-se no número de pontos de irradiação sobre o grupo muscular, parâmetros da terapia (energia, densidade de energia, potência, densidade de potência, tempo de tratamento), além do momento de aplicação: antes (pré-condicionamento muscular), durante ou após (recuperação muscular) do exercício físico. Conseqüentemente, a manipulação desse conjunto de variáveis contribui de forma expressiva para a ideia de dose-resposta, a qual tem um comportamento possivelmente bifásico (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011)

O número de pontos de irradiação parece ser importante para abranger todo o grupo muscular desejado em humanos, principalmente a disposição equidistante desses pontos para cobrir a maior área muscular e distribuir melhor a energia aplicada (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012). Os resultados dos trabalhos utilizando arranjos de lasers ou LEDs parecem ser melhores para a redução da fadiga e aumento de desempenho muscular comparado à utilização de um único diodo (LEAL JUNIOR *et al.*, 2008; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009a; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012). A figura 1 ilustra as diferentes metodologias quanto ao número e distribuição dos pontos de irradiação da LLLT e LEDT sobre o quadríceps femoral.

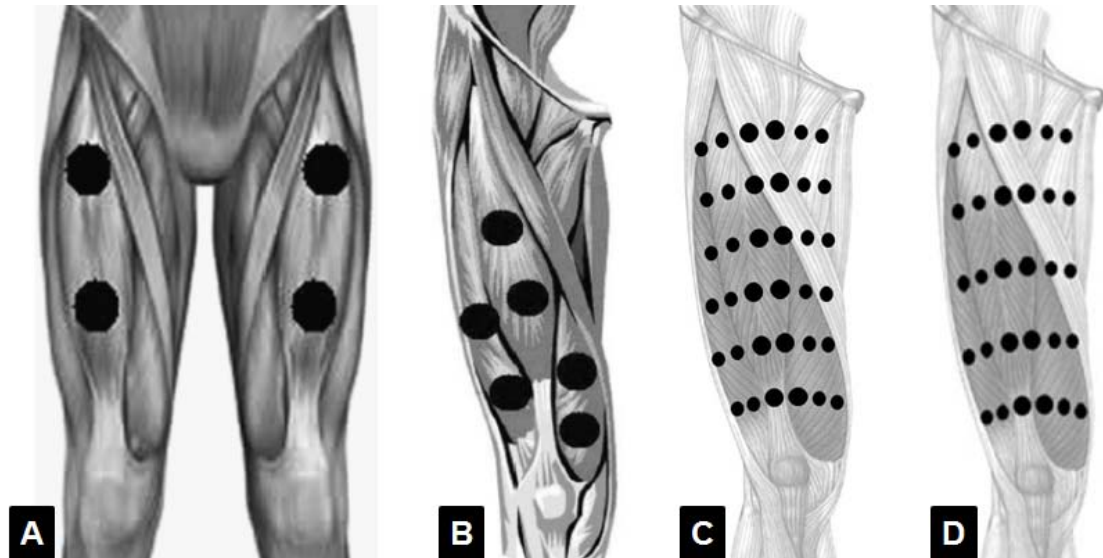


Figura 1. Número de pontos de irradiação sobre o quadríceps femoral utilizando a terapia laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy - LLLT*) ou terapia por LED (*light-emitting diode therapy - LEDT*). A (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009a); B (DE MARCHI *et al.*, 2011); C (FERRARESI *et al.*, 2011) e D (VIEIRA *et al.*, 2012).

Os parâmetros da LLLT e LEDT utilizados nos estudos são distintos quanto ao comprimento de onda nos modelos experimentais e trabalhos clínicos. No entanto, a radiação no infravermelho próximo parece ser a mais utilizada nos estudos clínicos, embora tenha se utilizado arranjos de LEDs com comprimentos de onda mistos: vermelho e infravermelho próximo.

A dosimetria e o momento da aplicação da fototerapia sobre os músculos ainda são objetos de estudo nos ensaios clínicos. Há uma grande variação na energia, potência, densidade de potência e tempo de irradiação, mas há consenso no modo de aplicação (contato). Os trabalhos clínicos que visaram os efeitos agudos da LLLT sobre a fadiga muscular utilizaram energia total (Joules), potência (W) e densidade de potências (W/cm^2) cada vez maiores a cada estudo, conforme tabela 2. No entanto, a energia total e a potência foram menores nos trabalhos clínicos de caráter crônico.

Os estudos clínicos que utilizaram a LEDT antes do exercício físico para a redução da fadiga muscular empregaram energias totais muito maiores que as empregadas nos estudos com LLLT. No entanto, a potência e densidade de potência foram menores, conforme tabela 2. Ainda não há consenso dos melhores parâmetros a serem empregados na LLLT ou LEDT, por isso mais trabalhos precisam investigar a dose-resposta dessas terapias para a redução da fadiga e o reparo do tecido muscular (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011).

Os estudos clínicos que utilizaram a LLLT e a LEDT em pré-condicionamento muscular reportam um efeito preventivo contra a disfunção mitocondrial e o dano muscular mediado por espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), bem como modulação do metabolismo energético. A irradiação por LLLT ou LEDT após o exercício físico visa não só recuperar a disfunção mitocondrial e metabólica, mas também recuperar as microlesões produzidas mecanicamente (contração muscular) e metabolicamente (ROS/RNS), além de modular o metabolismo energético e acelerar o reparo tecidual (VIEIRA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; SUSSAI *et al.*, 2010; FERRARESI *et al.*, 2011; LEAL JUNIOR *et al.*, 2011; FERRARESI *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012). A irradiação por LLLT ou LEDT antes (pré-condicionamento muscular), durante ou após (recuperação muscular) os exercícios físicos tem características distintas, mas mecanismos de ação comuns.

3. Mecanismos de ação da LLLT e LEDT no exercício físico

3.1 Metabolismo energético: Via mitocondrial

A radiação infravermelha emitida por LLLT e LEDT parece agir sobre o metabolismo celular, estimulando mudanças fotoquímicas e fotofísicas nas mitocôndrias celulares (BAKEEVA *et al.*, 1993; MANTEIFEL e KARU, 2005; HUANG *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010; KARU, 2010; FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012). Essas mudanças podem resultar em um potencial de membrana mitocondrial aumentado (KARU, 2008; HUANG *et al.*, 2011) e uma maior atividade enzimática na cadeia transportadora de elétrons (CTE) (HUANG *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010; KARU, 2010). As mudanças estruturais incluem a formação de mitocôndrias gigantes através da fusão de membranas de mitocôndrias menores e vizinhas (MANTEIFEL; BAKEEVA e KARU, 1997). Essas mudanças podem capacitar as mitocôndrias a fornecer altos níveis de consumo de O₂ e ATP para as células (SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010; FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012). Alguns estudos identificaram um aumento na atividade enzimática do complexo IV (citocromo c oxidase) (KARU, 2010) da CTE em músculo esquelético (HAYWORTH *et al.*, 2010). No entanto, além do complexo IV, outros estudos mostraram que todos os complexos da CTE (complexos I, II, III e IV) tiveram suas atividades enzimáticas aumentadas após irradiação com LLLT (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Vistos os efeitos da LLLT e LEDT sobre as mitocôndrias, algumas hipóteses baseiam-se nessa interação luz-tecido para elucidarem os benefícios da LLLT e LEDT nos exercícios de resistência (a) e também nos exercícios de força (b):

- a) Exercícios de resistência ou baixa intensidade: A capacidade oxidativa das fibras musculares é proporcional à sua densidade mitocondrial, pois são nessas organelas celulares onde ocorre a oxidação completa dos substratos energéticos (glicose, ácidos graxos e proteínas) para a síntese de ATP utilizado na contração muscular (TONKONOGLI *et al.*, 2000; TONKONOGLI e SAHLIN, 2002; COFFEY e HAWLEY, 2007; SAHLIN *et al.*, 2007; HAWLEY, 2009; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010). Apenas o exercício de baixa intensidade já é um potente estímulo para promover a biogênese mitocondrial, favorecer o metabolismo aeróbio e reduzir a fadiga muscular de origem metabólica, como o acúmulo de Pi, ADP, íons H⁺ e lactato no sarcoplasma (COFFEY e HAWLEY, 2007; ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; HAWLEY, 2009; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010). No entanto, quando esse estímulo é somado aos efeitos da fototerapia (LLLT e/ou LEDT) sobre as mitocôndrias, esse processo adaptativo pode ser aumentado. Mitocôndrias gigantes e mais funcionais (maior atividade enzimática) podem fornecer altos níveis de respiração celular e síntese de ATP (HUANG *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010) para os exercícios físicos, podendo refletir no consumo de oxigênio (DE MARCHI *et al.*, 2011) e na redução da fadiga muscular (VIEIRA *et al.*, 2012).
- b) Exercícios de força ou alta intensidade: são exercícios que possuem o metabolismo energético anaeróbio alático e láctico predominantes (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011), como os exercícios realizados na maioria dos estudos envolvendo a LLLT e LEDT em humanos (ver tabela 2). Baseado em três hipóteses sugeridas por FERRARESI

et al. (2011) e VIEIRA *et al.* (2012), a LLLT e LEDT podem aumentar o desempenho muscular e diminuir a fadiga por três mecanismos:

b.1) ATP mitocondrial (primeira hipótese): a LLLT e LEDT parecem aumentar a atividade mitocondrial, proporcionando altos níveis de respiração celular e síntese de ATP (HUANG *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010). Uma vez que o recrutamento muscular nos exercícios de força é hierárquico e em rampa (fibras tipo I, IIa, IIx e IIb, respectivamente) (HODSON-TOLE e WAKELING, 2009), maiores quantidades de ATP podem ser fornecidas pelas fibras musculares com potencial oxidativo (fibras tipo I e IIa) durante os exercícios de força ou alta intensidade (FERRARESI *et al.*, 2011).

b.2) Resíntese de fosfocreatina (segunda hipótese): os exercícios de força consomem uma grande quantidade de ATP proveniente da hidrólise da fosfocreatina (PCr), a qual é catalisada pela enzima creatina kinase muscular (CK) no sarcoplasma: $PCr + ADP \leftrightarrow Cr + ATP$. Esse consumo de ATP é mais rápido que a taxa de resíntese da PCr, produzindo um excesso de creatina (Cr), ADP e Pi no citosol das células musculares, principalmente das fibras IIa, IIx e IIb, contribuindo para o processo de fadiga (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010). No entanto, altas concentrações de ADP e Cr estimulam a respiração e a síntese de ATP mitocondrial nas fibras musculares do tipo I e IIa (fibras com alta e média densidade mitocondrial, respectivamente) (TONKONOOGI e SAHLIN, 2002), integrando os metabolismos aeróbio e anaeróbio alático nesse tipo de exercício físico [Figura 2 – A, B e C] (FERRARESI *et al.*, 2011). Essa integração refere-se ao processo de resíntese de PCr através do sistema de lançadeiras de Cr

mitocondrial (TONKONOGI e SAHLIN, 2002; FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012). O sistema de lançadeiras de creatina capta o ADP e Pi resultantes da utilização do ATP na contração muscular e os transporta até a matriz mitocondrial, passando pela membrana interna dessa organela por meio de uma translocase de nucleotídeos de adenina. O ATP produzido pela fosforilação oxidativa faz o mesmo caminho, porém no sentido contrário, fornecendo energia para a reação de resíntese de PCr próxima ao sítio contrátil, sendo essa reação catalisada pela CK muscular. Concomitantemente a esse processo, a utilização da energia da PCr para resintetizar o ATP muscular gera Cr, ADP e Pi. Enquanto o ADP e Pi seguem o caminho já descrito anteriormente, a Cr é transportada até o espaço intermembranas da mitocôndria muscular e a CK mitocondrial catalisa a reação de resíntese de PCr utilizando também o ATP produzido pela fosforilação oxidativa. Por fim, a PCr é transportada ao sítio de contração muscular para fornecer a energia necessária à atividade contrátil, aumentando a razão ATP/ADP [Figura 2B]. Dessa maneira, a resíntese de PCr nos intervalos (FERRARESI *et al.*, 2011) e durante os exercícios de alta intensidade (VIEIRA *et al.*, 2012) seria capaz de fornecer grande parte da energia utilizada nessas atividades, proporcionar a resíntese do ATP utilizado durante uma sessão de treinamento, ou ainda ser fonte predominante nos testes máximos de força muscular (FERRARESI *et al.*, 2011).

b.3) Oxidação de lactato pelas mitocôndrias (terceira hipótese): o lactato sanguíneo tem sido muito utilizado para mensurar a fadiga muscular nos exercícios de força ou alta intensidade (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010). Quando o aporte de oxigênio é

insuficiente e/ou demorado para a produção de ATP mitocondrial nos exercícios de alta intensidade, o piruvato é reduzido por NADH+H proveniente da glicólise para a produção anaeróbia de ATP. Essa reação é catalisada pela enzima lactato desidrogenase citosólica (LDH) com a formação de lactato (BROOKS *et al.*, 1999). O lactato é transportado para a matriz mitocondrial via transportadores de monocarboxilados e, por meio de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado) e da lactato desidrogenase mitocondrial, o lactato é oxidado a piruvato. Em seguida o NAD reduzido (NADH) é oxidado na CTE e fornece os elétrons e prótons necessários para a produção de ATP mitocondrial. O piruvato é oxidado à acetil-CoA e no ciclo de Krebs continua a ser oxidado para produzir ATP aerobiamente através da CTE [Figura 2C]. Esse mecanismo de oxidação de lactato pelas mitocôndrias foi inicialmente proposto por BROOKS *et al.* (1999) e recentemente discutido por FERRARESI *et al.* (2011).

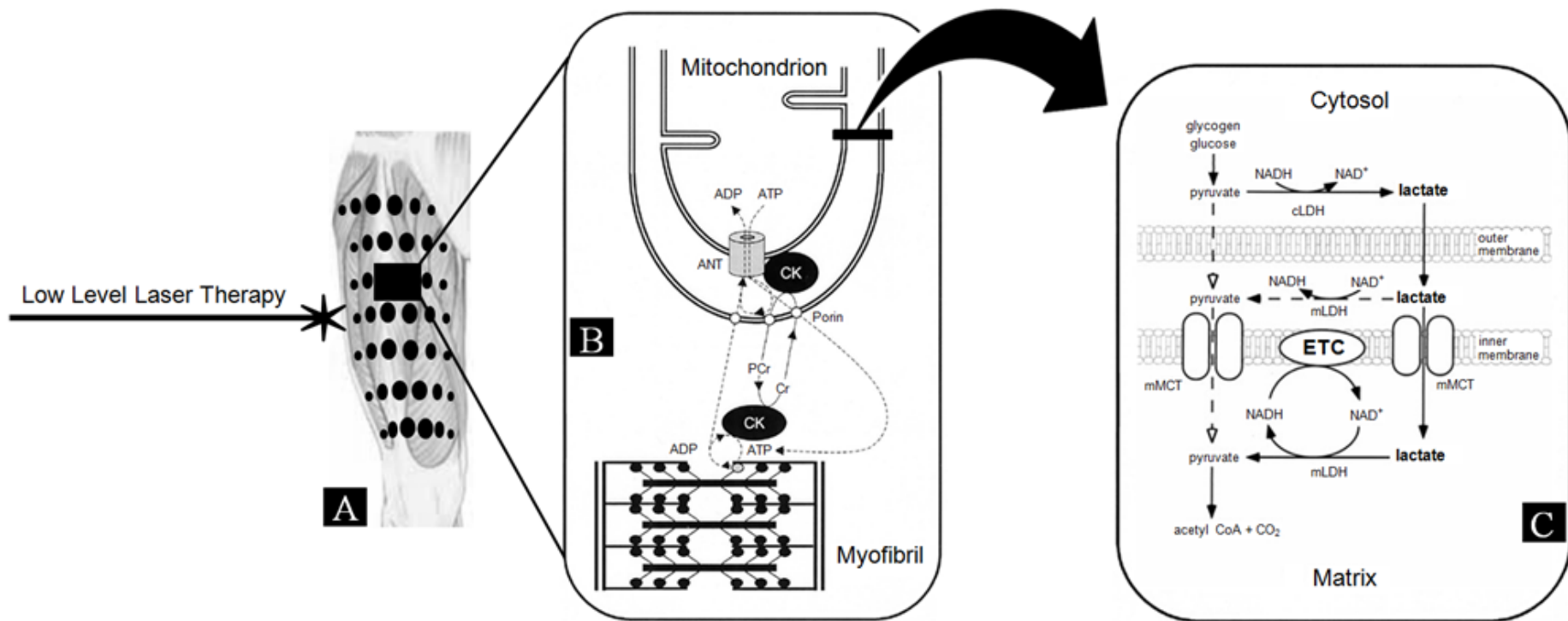


Figura 2. (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). (A) Pontos de irradiação da terapia laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy – LLLT*) sobre o quadríceps femoral. (B) Mecanismo de lançadeira de creatina mitocondrial. (C) Oxidação de lactato pelo via mitocondrial.

3.2 Metabolismo energético: Modulação enzimática

A enzima LDH é responsável pela redução do piruvato a lactato (Piruvato + NADH+H \leftrightarrow H-lactato + NAD⁺) para a produção de ATP pela via anaeróbia láctica. A atividade da LDH é frequentemente associada a mensurações de lactato sanguíneo para inferir a magnitude da utilização dessa via energética, a intensidade do exercício e também quão eficiente está o tamponamento do ácido láctico para evitar a acidose metabólica (H-lactato + NaHCO₃ \rightarrow Na-lactato + H₂O + CO₂) e prevenir a fadiga muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; WESTERBLAD; BRUTON e KATZ, 2010; VIEIRA *et al.*, 2012).

A LLLT parece modular a atividade enzimática da LDH nos exercícios físicos, como demonstrado e sugerido por estudos prévios (VIEIRA *et al.*, 2006; BARONI *et al.*, 2010a; DE MARCHI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012). Esses estudos demonstram que a LDH tem sua atividade inibida pela LLLT mesmo nos exercícios em que o aporte de O₂ é lento ou insuficiente para a produção de ATP pela via mitocondrial, além aumentar o desempenho muscular (VIEIRA *et al.*, 2006; BARONI *et al.*, 2010a; DE MARCHI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012).

As enzimas do metabolismo aeróbio também são moduladas pela fototerapia (LLLT e LEDT), como as enzimas dos complexos I, II, III e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (HUANG *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010; KARU, 2010), favorecendo o metabolismo aeróbio. Outras enzimas do metabolismo aeróbio possivelmente são moduladas pela LLLT e LEDT, como a citrato sintase e outras enzimas do ciclo de Krebs, pois o ciclo de Krebs fornece parte dos prótons e elétrons necessários para a síntese de ATP na cadeia transportadora de elétrons.

3.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS)

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o radical livre de oxigênio primário e no músculo esquelético é principalmente produzido pelas mitocôndrias e a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida) (NADPH) oxidase (POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). Na mitocôndria o $O_2^{\bullet-}$ é produzido como um subproduto da fosforilação oxidativa e por isso suas concentrações estão sempre muito associadas à atividade mitocondrial, principalmente durante os exercícios físicos (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). O $O_2^{\bullet-}$ é principalmente produzido pelo complexo I e III da cadeia CTE, liberando $O_2^{\bullet-}$ na matriz mitocondrial e no espaço intermembranas, respectivamente. A taxa de produção de $O_2^{\bullet-}$ é de aproximadamente 0.15% do consumo de oxigênio na mitocôndria, somado à atividade enzimática de NADPH oxidase, xantina oxidase e lipoxigenases que também produzem $O_2^{\bullet-}$ (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). Além do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^{\bullet}) também são espécies reativas de oxigênio de grande importância (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011).

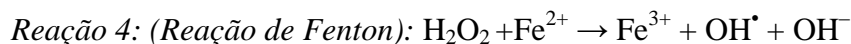
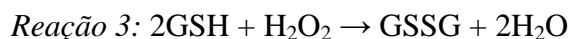
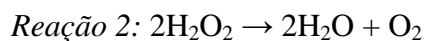
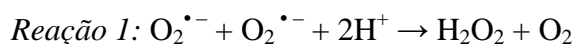
O óxido nítrico (NO^{\bullet}) é o radical livre de nitrogênio primário. NO^{\bullet} é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS). NO^{\bullet} pode ser formado a partir de ânions inorgânicos de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) ou interagir com ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). No músculo esquelético adulto há expressão de três isoformas de NOS: neuronal (nNOS ou tipo 1), induzível (iNOS ou tipo 2) e endotelial (eNOS ou tipo 3). No entanto,

a isoforma predominante é a nNOS (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011) .

ROS e RNS são produzidos pelas mitocôndrias, atividade enzimática de NADPH oxidase no retículo sarcoplasmático e nos túbulos transversos, fosfolipase A₂ e xantina oxidase (POWERS e JACKSON, 2008). No entanto, naturalmente produzimos defesas contra a atividade de ROS e RNS sobre as células e tecidos. Essas defesas são principalmente a atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (CAT) (POWERS e JACKSON, 2008). Existem três isoformas de SOD (SOD1-3) e cinco isoformas de GPX (GPX1-5), cada qual com sua localização específica na célula e no meio extracelular. Para maior detalhamento ver revisão de Powers e Jackson (2008).

O ânion superóxido é rapidamente quebrado em peróxido de hidrogênio por enzimas antioxidantes (Reação 1) como a superóxido dismutase mitocondrial (SOD2). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é quebrado pela enzima catalase (Reação 2) e por glutathiona peroxidase com a conversão da glutathiona reduzida (GSH) para glutathiona oxidada (GSSG) (Reação 3) (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). Também, o peróxido de hidrogênio pode reagir com metais como o Fe²⁺ (Reação 4 – Reação de Fenton), a qual produz radicais hidroxil (OH[•] e OH⁻) extremamente reativos (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). Já o Fe³⁺ está presente na mioglobina, hemoglobina, citocromo c oxidase e pode ser reduzido a Fe²⁺ por radicais superóxido e então gerar radicais hidroxil (Reação 5 – Reação de Haber-Weiss). Os radicais hidroxil têm um tempo de meia vida pequeno, pois reagem com qualquer molécula orgânica e podem lesar proteínas, DNA e lipídios, como os lipídios presentes na membrana das células e conseqüentemente gerar dano

tecidual (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; WESTERBLAD e ALLEN, 2011).



Durante a atividade física, a contração do músculo esquelético é a principal fonte de produção de ROS e RNS, promovendo efeitos deletérios nas fibras musculares, como dano celular e tecidual, perda da função contrátil e de desempenho no exercício (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; LAMB e WESTERBLAD, 2011; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). ROS e RNS podem induzir o aparecimento da fadiga muscular precoce no exercício físico por influenciar muitos dos mecanismos envolvidos na contração muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008) como:

- a) Diminuição da produção de ATP: a produção de NO^{\bullet} nas mitocôndrias pode limitar a produção de ATP mitocondrial por inibir a enzima citocromo c oxidase, além de inibir também a atividade enzimática da CK muscular e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (via glicolítica) e assim diminuir a produção de ATP (POWERS e JACKSON, 2008).
- b) Regulação do retículo sarcoplasmático e liberação de Ca^{2+} : ROS aumenta o conteúdo de Ca^{2+} no citosol da célula muscular (sarcoplasma), refletindo em lentidão na recaptção do Ca^{2+} (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008). ROS também inibi a atividade da enzima ATPase

da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), interferindo na hidrólise do ATP utilizado para o funcionamento da bomba de Ca^{2+} (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008). NO^\bullet também inibi a atividade da SERCA e resulta na diminuição da recaptção do Ca^{2+} do sarcoplasma para o retículo sarcoplasmático (POWERS e JACKSON, 2008). Prolongadas exposições a ROS e RNS podem induzir uma duradoura liberaçã de Ca^{2+} por alterar a sensibilidade dos receptores dos canais de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (WESTERBLAD e ALLEN, 2011).

- c) Proteínas contráteis: ROS e RNS podem alterar a estrutura das proteínas contráteis; diminuir a sensibilidade dos miofibrilas ao Ca^{2+} ; oxidar actina, miosina e troponina C, prejudicando a formaçã das pontes cruzadas, da contraçã e a produçã de força muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008; LAMB e WESTERBLAD, 2011; WESTERBLAD e ALLEN, 2011).
- d) Potencial de açã: ROS parece reduzir o funcionamento da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ e exacerbar a quantidade de K^+ extracelular, reduzindo o potencial de açã para a despolarizaçã das fibras musculares durante o exercício físico, contribuindo para o surgimento da fadiga precoce (WESTERBLAD e ALLEN, 2011).
- e) ROS e RNS após a fadiga muscular: ROS diminui a sensibilidade das miofibrilas ao Ca^{2+} tanto por acúmulo de H_2O_2 (via SOD2) quanto por OH^\bullet (via Reaçã de Fenton), prejudicando a funçã contrátil (LAMB e WESTERBLAD, 2011; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). Altos níveis de $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode também inibir a liberaçã de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e/ou reagir com NO^\bullet para formar ONOO^- que também prejudica a liberaçã de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (LAMB e WESTERBLAD, 2011; WESTERBLAD e ALLEN, 2011). Além disso, NO^\bullet também pode se ligar a metais de transiçã (POWERS e JACKSON, 2008),

como o Fe, e prejudicar a função mitocondrial (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004; HUANG *et al.*, 2009).

- f) Dano muscular: os lipídios que compõem a membrana da célula muscular (sarcolema) são atacados por ROS e RNS no processo de peroxidação lipídica. Com o rompimento do sarcolema, a célula morre e todo o seu conteúdo é liberado para o meio extracelular, provocando inflamação (degradação do conteúdo celular), edema, dor e perda de função contrátil (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008). Nesse processo, os níveis sanguíneos de CK muscular estão elevados, tornando-se um bom parâmetro para a quantificação do dano muscular (MARKERT *et al.*, 2011).

A LLLT e LEDT têm sido associadas ao combate de ROS e RNS produzidos nos exercícios físicos (XU *et al.*, 2008; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009a; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009d; LIU *et al.*, 2009; BARONI *et al.*, 2010a; BARONI *et al.*, 2010b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; SUSSAI *et al.*, 2010; DE MARCHI *et al.*, 2011; LEAL JUNIOR *et al.*, 2011; DE ALMEIDA *et al.*, 2012) para a melhora da função mitocondrial e muscular que possivelmente contribuem para a redução da fadiga e aumento de desempenho muscular. A LLLT e a LEDT têm como cromóforo comum a citocromo c oxidase (Cox) e os principais efeitos dessa interação luz-cromóforo são maior síntese de ATP e aumento da função mitocondrial (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004; XU *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010; KARU, 2010). A relação entre luz, mitocôndria, ROS e RNS envolve a dismutação de espécies reativas de oxigênio e a fotodissociação de NO-Cox, contribuindo para o restabelecimento do

consumo de oxigênio e a síntese de ATP (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004; HUANG *et al.*, 2009).

A fotodissociação de NO-Cox configura-se na hipótese de que o NO pode competir com o oxigênio para se ligar aos complexos ferro-enxofre (complexo I) e aos centros de ferro e cobre (complexo IV) da CTE e inibir a síntese de ATP (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004; HUANG *et al.*, 2009), principalmente em células metabolicamente estressadas (HUANG *et al.*, 2009; KARU, 2013), como ocorre após contração muscular (XU *et al.*, 2008). No entanto, a ligação entre NO-Cox pode ser quebrada pela energia da luz na faixa do visível e no infravermelho próximo (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2005), restabelecendo a função mitocondrial para a síntese de ATP (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004; XU *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010). Dessa maneira, a aplicação da LLLT ou LEDT após a atividade física pode ser mais efetiva, ou promover melhores resultados comparados à aplicação antes do exercício (DOS REIS *et al.*, 2014).

É sabido que o exercício físico pode diminuir o pH intracelular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008) e um acúmulo de H⁺ pode inativar a Cu-Zn-SOD (SOD1 e 3) por protonação do resíduo da histidina 61 (Hys61) no centro ativo dessas enzimas (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004). No entanto, a LLLT pode reverter esse processo e reativar a SOD1 e 3 (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004) [Figura 3].

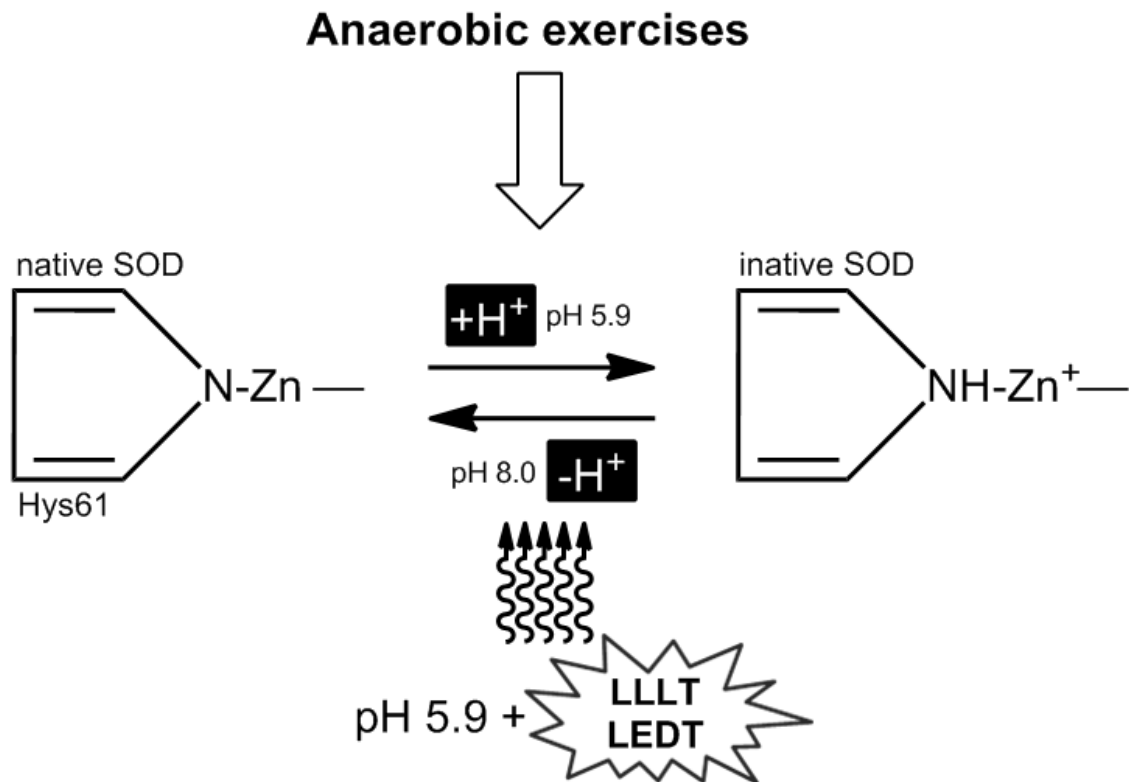


Figura 3. (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Desprotonação da histidina e formação da ligação de N-Zn (Nitrogênio-Zinco) para restaurar o centro ativo e atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) por terapia laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy - LLLT*) ou terapia por LED (*light-emitting diode therapy - LEDT*).

DE MARCHI *et al.* (2011) identificaram que a atividade da SOD não sofreu alteração mesmo após exercício intenso, aumentando o desempenho físico no exercício comparado ao grupo placebo, o qual apresentou diminuição na atividade da SOD e pior desempenho. LIU *et al.* (2009) encontraram aumentos de 44% e 58% da atividade da SOD após 24h e 48h de exercício excêntrico e irradiação com LLLT.

Possivelmente a LLLT e LEDT melhoram a função mitocondrial, a dismutação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) via SOD e menor formação de peroxinitrito (ONOO^-) (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004), quebra a molécula de H_2O_2 via CAT e GPX e reduz a formação de radicais hidroxil que contribuem para o menor dano à

membrana das células musculares, como evidenciado por menor peroxidação lipídica e níveis sanguíneos de CK muscular mostrada em trabalhos prévios (LIU *et al.*, 2009; DE MARCHI *et al.*, 2011). Também, a ativação de calpains e caspases mediadas por ROS (POWERS e JACKSON, 2008) pode ser inibida por LLLT e LEDT, uma vez que essas terapias podem modular o estresse oxidativo (VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004; DE MARCHI *et al.*, 2011). As figuras 4 e 5 ilustram a ação da LLLT e LEDT sobre enzimas antioxidantes, ROS e RNS na contração muscular, respectivamente.

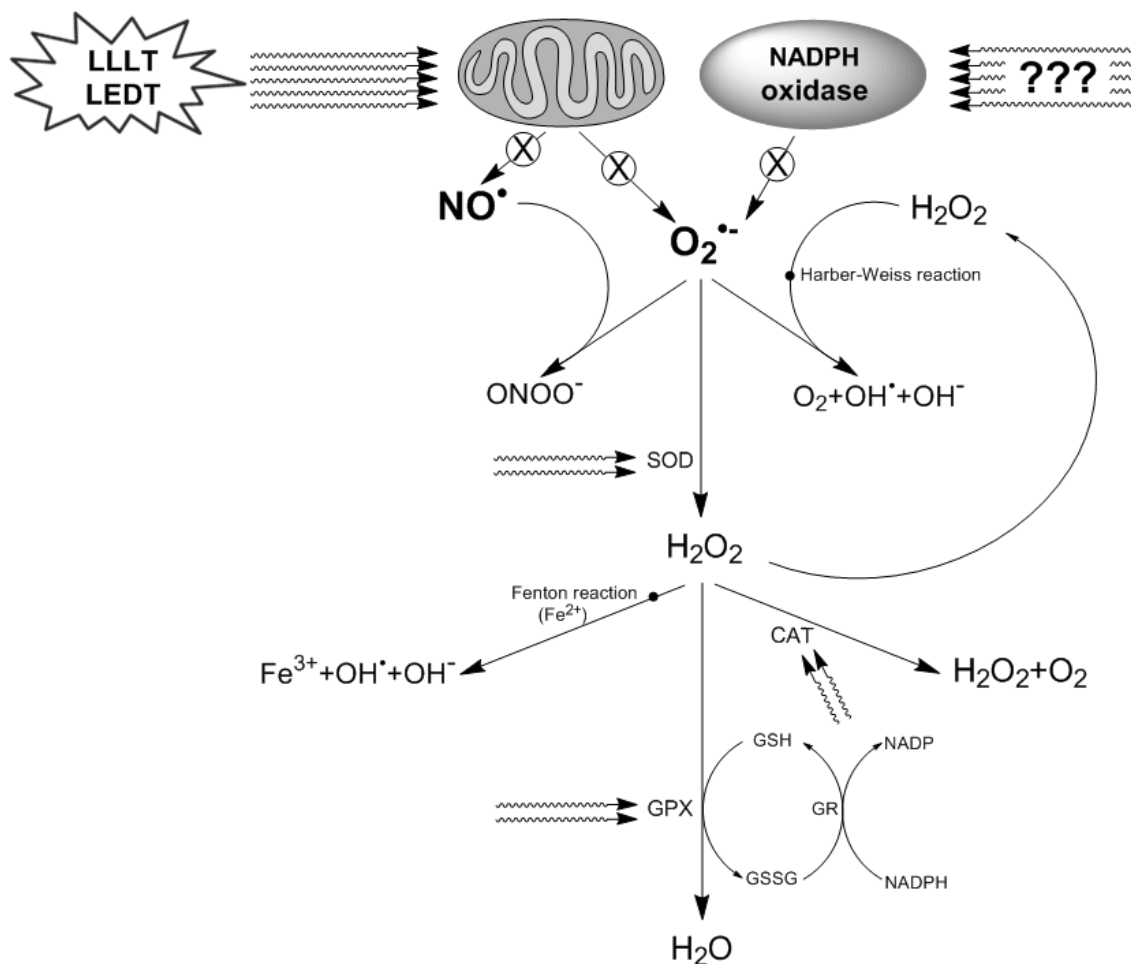


Figura 4. (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Efeitos da terapia laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy* – LLLT) ou terapia por LED (*light-emitting diode* – LEDT) sobre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) de produção e de enzimas antioxidantes. NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida) oxidase; X : diminuição ou inibição de produção.

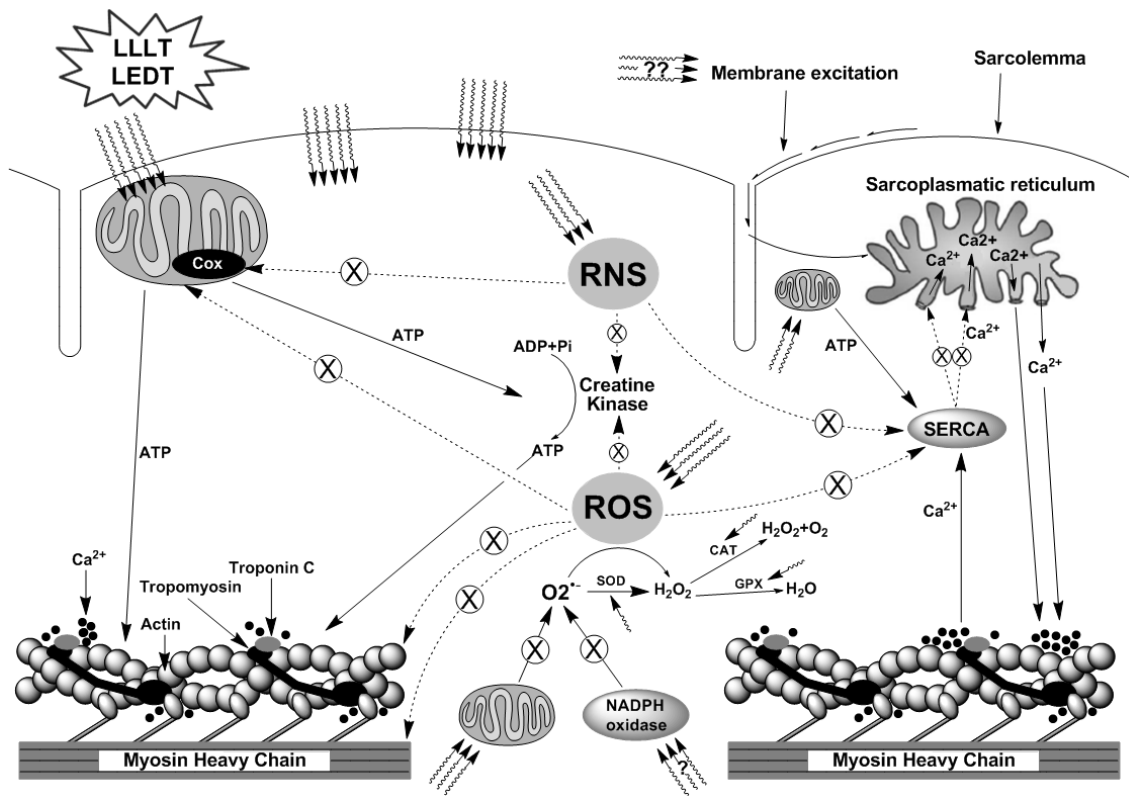


Figura 5. (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Efeitos da terapia laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy - LLLT*) ou terapia por LED (*light-emitting diode therapy - LEDT*) sobre espécies reativas de oxigênio (ROS); espécies reativas de nitrogênio (RNS); mitocôndrias e contração muscular. SERCA= bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Linha tracejada= atividade inibida. \otimes = diminuição da função ou inibido.

No entanto, além do aumento da função mitocondrial e atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPX; outros mecanismos de ação da LLLT e LEDT podem estar relacionados à redução da fadiga e aumento de desempenho muscular, como: (i) melhora da sensibilidade das miofibrilas e dos canais de Ca^{2+} ao íon Ca^{2+} ; (ii) aumento da recaptção de Ca^{2+} do sarcoplasma para o retículo sarcoplasmático via bomba de Ca^{2+} (ATP dependente); (iii) melhora da formação das pontes cruzadas e a produção de força contrátil; (iv) aumento do funcionamento da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (ATP dependente) para diminuir o excesso de K^+ extracelular e garantir a despolarização das fibras musculares para a continuação do exercício físico; (v) menor dano tecidual e

extravasamento de conteúdo muscular para o sangue, como a enzima CK muscular e mioglobina.

3.4 Reparo do dano muscular

O dano muscular consiste na ruptura das miofibrilas, processo o qual é acompanhado de inflamação no sítio de lesão e perda da função contrátil (JARVINEN *et al.*, 2005). A regeneração do tecido muscular após diferentes estímulos lesivos é um processo que ocorre geralmente em 6 fases que duram cerca de 21 dias (JARVINEN *et al.*, 2005): (fase 1 – dia 2 após lesão) necrose do tecido muscular lesionado, inflamação aguda com formação de edema, aumento dos depósitos de colágeno com formação de tecido conectivo e cicatricial; (fase 2 – dia 3) ativação de células satélites; (fase 3 – dia 5) fusão de mioblastos ao sítio de lesão e aumento da densidade do tecido conectivo; (fase 4 – dia 7) as células musculares em regeneração estendem-se para fora dos antigos cilindros da lâmina basal para o sítio de lesão e começam a perfurar o tecido cicatricial; (fase 5 – dia 14) a cicatriz no sítio de lesão reduz de tamanho e as novas miofibrilas fecham o *gap* no sítio de lesão; (fase 6 – dia 21) entrelaçamento e fusão das extremidades das miofibrilas e pouca participação de tecido cicatricial e conectivo nesse processo.

A regeneração do tecido muscular é limitada, mas possível pela ativação, proliferação e diferenciação das células satélites musculares em novos mionúcleos e/ou miofibrilas (HAWKE e GARRY, 2001; CHARGE e RUDNICKI, 2004; JARVINEN *et al.*, 2005; KUANG e RUDNICKI, 2008). As células satélites localizam-se na lâmina basal das miofibrilas e podem estar quiescentes, em proliferação ou em diferenciação de acordo com o estímulo lesivo (HAWKE e GARRY, 2001; CHARGE e RUDNICKI, 2004; KUANG e RUDNICKI, 2008). Essas células são consideradas células de reserva,

pois apesar de não sofrerem total desenvolvimento embrionário, são capazes de retomar esse programa de miogênese em resposta a uma lesão muscular (MAURO, 1961), como as microlesões decorrentes do treinamento de força ou alta intensidade (HAWKE e GARRY, 2001; CHEN e GOLDHAMER, 2003; CHARGE e RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN e RUDNICKI, 2005; KUANG e RUDNICKI, 2008; WILBORN *et al.*, 2009).

As lesões musculares geram inflamação, maior concentração de neutrófilos e macrófagos no sítio de lesão que atraem quimiotaticamente as células satélites (HAWKE e GARRY, 2001; CHARGE e RUDNICKI, 2004). As células satélites então são ativadas, proliferam e se diferenciam por mecanismos moleculares, como a modulação da expressão de genes relacionados à quiescência (*Pax7*, *c-Met*, *Myf5*), proliferação/ativação (*MyoD1*, *Myf5*, *M-cadherin*) e diferenciação (*Desmin*, *Myogenin* e *MRF4*) (HAWKE e GARRY, 2001; CHARGE e RUDNICKI, 2004).

As células satélites já diferenciadas podem ser fundidas as fibras musculares lesadas como novos mionúcleos, fornecendo maior suporte genético para a expressão de novas proteínas contráteis e melhora do domínio mionuclear (VIERCK *et al.*, 2000; HARRIDGE, 2007; PETRELLA *et al.*, 2008). Ou ainda podem ser ativadas e formarem mioblastos que se fundem para a formação de miotubos que originarão novas miofibrilas (HAWKE e GARRY, 2001; CHARGE e RUDNICKI, 2004).

Visto a importância das células satélites no processo de reparo ao dano muscular, alguns autores investigaram os efeitos da LLLT sobre essas células (ROTH e ORON, 1985; WEISS e ORON, 1992; 1994; 2002). Estudos em modelos experimentais mostraram que a LLLT aumentou a formação de novas miofibrilas que preencheram o *gap* da lesão muscular e devolveram as características contráteis ao sítio de lesão (ROTH e ORON, 1985; WEISS e ORON, 1992). Bibikova e Oron (1994) observaram

que a LLLT (632,8) promoveu uma maior maturação de miofibrilas jovens comparadas àquelas não irradiadas. SHEFER *et al.* (2002) verificaram aumento no número e na ativação de células satélites ao redor de miofibrilas irradiadas com LLLT (632,8). SHEFER *et al.* (2002) também observaram que a LLLT (632,8) foi eficiente para aumentar os níveis de Bcl-2 (viabilidade celular) e diminuir BAX (apoptose celular). NAKANO *et al.* (2009) observaram que a LLLT (830 nm) aumentou a quantidade de células satélites (marcação por BrdU – 5-bromo-2-deoxyuridine), aumentou a vascularização e preservou o diâmetro da miofibrilas de ratos submetidos a processo de atrofia muscular por desuso.

Ainda é desconhecido qualquer estudo que tenha envolvido LLLT ou LEDT e a atividade das células satélites em humanos. Apenas estudos *in vitro* ou modelos experimentais são reportados na literatura científica, os quais evidenciam a positiva influência da LLLT no ciclo celular, proliferação e ativação dessas células (WEISS e ORON, 1992; BEN-DOV *et al.*, 1999; SHEFER *et al.*, 2002; SHEFER *et al.*, 2003).

Além das células satélites, o controle da inflamação, proteólise, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), síntese e remodelamento de colágeno e a disponibilidade de ATP são fundamentais para o sucesso do reparo do dano muscular (RIZZI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2011; DOURADO *et al.*, 2011; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; RENNO *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2013). Trabalhos em modelos experimentais têm demonstrado que a LLLT é eficiente para modular a quantidade de colágeno no sítio de lesão (RIZZI *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2013); inibir a inflamação por menor expressão de TNF- α e COX-2 (LIU *et al.*, 2009; DE ALMEIDA *et al.*, 2011; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; RENNO *et al.*, 2011); diminuir ROS por menor peroxidação lipídica (menores níveis de TBARS - substâncias reativas ao

ácido tiobarbitúrico) e MDA (malondialdeído)) (RIZZI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2013); reduzir RNS por inibir a síntese de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) (RIZZI *et al.*, 2006); diminuir a expressão de NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) e os níveis de CK (relacionado a proteólise) (RIZZI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2013); aumentar a atividade antioxidante de SOD (LIU *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2012); aumentar a expressão do receptor de VEGF (VEGFR-1 – *vascular endothelial growth factor receptor 1*) nos capilares e nas células satélites (DOURADO *et al.*, 2011) e maior atividade da cadeia transportadora de elétrons para maior síntese de ATP no reparo do dano muscular (SILVEIRA *et al.*, 2009).

3.5 Efeitos genéticos

Diversos trabalhos na literatura científica reportam vias de sinalizações moleculares específicas de cada tipo de treinamento físico, onde a expressão e/ou a supressão de genes específicos são fundamentais para o melhor desempenho físico (ADHIHETTY *et al.*, 2003; BODINE, 2006; FLUCK, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007; FAVIER; BENOIT e FREYSSINET, 2008; HAWLEY, 2009; STEPTO *et al.*, 2009).

Os exercício de força ou de alta intensidade possui vias de sinalizações bem definidas e que modulam genes referentes às células satélites musculares no estado quiescente (genes c-Met, Myf5 e Pax7), ativado (genes MyoD1, Myf5, M-cadherin) e em diferenciação para a formação de novos mionúcleos e/ou miofibrilas (genes *Desmin*, *Myogenin* e MRF4) em resposta às microlesões oriundas do treinamento de força (HAWKE e GARRY, 2001; CHEN e GOLDHAMER, 2003; CHARGE e

RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN e RUDNICKI, 2005; KUANG e RUDNICKI, 2008; WILBORN *et al.*, 2009). Também, os exercícios de força ou de alta intensidade são influenciados por genes relacionados à síntese proteica (hipertrofia muscular) como IGF-1, AKT, mTOR e p70^{S6K} (BODINE, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007). E genes que regulam a degradação proteica (atrofia muscular), como TNF- α , FoxO, FBXO32, TRIM63 or MuRF1, MSTN e enzimas E3 ubiquitina ligases que participam do processo proteolítico por meio do sistema de ubiquitina proteossoma (GLASS, 2005; BODINE, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007; FAVIER; BENOIT e FREYSSINET, 2008; HAWLEY, 2009).

As adaptações genéticas relacionadas aos exercícios resistência ou baixa intensidade referem-se à biogênese mitocondrial, envolvendo a super expressão dos genes Cox, NRF 1/2, TFAM e PPARGC-1 α , (GLASS, 2005; BODINE, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007; FAVIER; BENOIT e FREYSSINET, 2008; HAWLEY, 2009). Quando PPARGC-1 α é muito expresso, há indicação de que a biogênese mitocondrial e a utilização de ácidos graxos como fonte energética é maior no tecido muscular, relacionando-se também com a transição entre os tipos de fibras (tipo II para o tipo I, a qual possui maior potencial oxidativo) (ADHINETTY *et al.*, 2003; FLUCK, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007). Essa transição proporciona adaptações biomecânicas como resistência à fadiga nos exercícios extenuantes de baixa a média intensidade e de longa duração (ADHINETTY *et al.*, 2003; FLUCK, 2006; COFFEY e HAWLEY, 2007).

A identificação e compreensão de mecanismos moleculares modulados pela fototerapia (LLLT e LEDT) podem auxiliar o entendimento dos efeitos dessas terapias sobre as adaptações genéticas relacionadas aos diferentes tipos de exercícios (COFFEY e HAWLEY, 2007; HAWLEY, 2009; STEPTO *et al.*, 2009), como sugerido

previamente (FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012). No entanto, a literatura é escassa de trabalhos que envolvem a expressão gênica em humanos, pois envolve procedimentos invasivos, como a biópsia muscular (STEPTO *et al.*, 2009).

Com essa perspectiva, FERRARESI *et al.* (2012) investigaram os efeitos da LLLT (arranjo com seis diodos de 808 nm) sobre o desempenho físico de 10 homens jovens submetidos a treinamento físico de força. Os resultados preliminares desse estudo mostraram que o grupo irradiado com LLLT aumentou a expressão dos genes PPARGC1- α (biogênese mitocondrial), mTOR (síntese protéica e hipertrofia muscular) e VEGF (angiogênese). Também apenas o grupo LLLT subexpressou MuRF1 (degradação protéica e atrofia muscular) e IL-1 β (inflamação) [Figura 6].

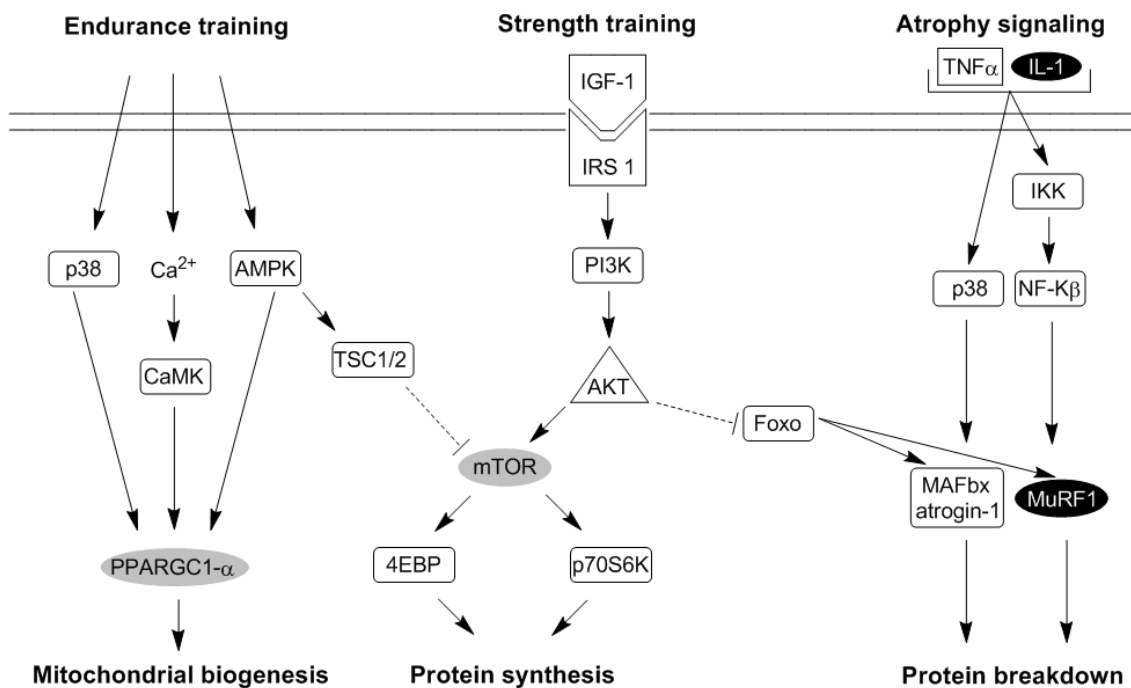


Figura 6. (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Sinalização para biogênese mitocondrial, síntese de proteínas e degradação de proteínas modulada pela terapia a laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy* – LLLT) associado ao exercício. Caixas em cinza referem-se à super expressão do gene e caixas em preto referem-se à repressão do gene.

3.6. Possíveis mecanismos de ação da fototerapia a serem investigados

3.6.1 Alteração da relação entre ADP, Pi, Mg²⁺, pH e Ca²⁺

O acúmulo de Pi, NAD e Mg²⁺ no sarcoplasma pode diminuir a liberação de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático, diminuir a recaptção de Ca²⁺ pela bomba de Ca²⁺, promover a perda da sensibilidade das miofibrilas aos íons Ca²⁺ e provocar diminuição da força contrátil que resulta na fadiga muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). Durante as contrações tetânicas para a indução de fadiga precoce, o Pi pode reduzir a ligação entre o Ca²⁺ e a troponina C (TnC), inibir ou até mesmo reverter a bomba de Ca²⁺ no retículo sarcoplasmático, contribuindo para o maior concentração de Ca²⁺ no citosol da célula muscular. Em contrapartida, no processo de fadiga tardia, o Pi pode inibir os canais de liberação de Ca²⁺, ou ainda ligar-se ao Ca²⁺ (Pi-Ca²⁺) e precipitar no retículo sarcoplasmático, diminuindo a quantidade disponível de Ca²⁺ para iniciar a contração muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008).

A diminuição do pH no citosol celular reduz a afinidade do Ca²⁺ nas fibras musculares, provavelmente pela competição entre os íons H⁺ e Ca²⁺ para ligarem-se a TnC (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). A LLLT e LEDT talvez tenha algum efeito modulador sobre a liberação do Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático e sobre a ligação do Ca²⁺ à TnC por modular o metabolismo energético celular via mitocôndrias, resíntese de PCr e redução da atividade enzimática da LDH.

A bomba de Ca²⁺, em especial, talvez tenha sua função melhorada com a LLLT e LEDT, uma vez que é ATP dependente (TONKONOJI e SAHLIN, 2002). Ou ainda a LLLT e LEDT facilitem a dissociação entre Pi-Ca²⁺ e aumentem a disponibilidade de Ca²⁺ para a contração muscular. Esses mecanismos envolvendo o íon Ca²⁺ podem,

talvez, explicar a ação da fototerapia na redução da fadiga muscular nas contrações tetânicas induzidas por estimulação elétrica neuromuscular (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; DE ALMEIDA *et al.*, 2011) e da LLLT e LEDT nos exercícios de alta intensidade (LEAL JUNIOR *et al.*, 2008; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009d; BARONI *et al.*, 2010a; BARONI *et al.*, 2010b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; DE MARCHI *et al.*, 2011; FERRARESI *et al.*, 2011; DE ALMEIDA *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012).

3.6.2 Excitabilidade da fibra muscular e eletromiografia (EMG)

A contração muscular depende da excitação elétrica da fibra muscular. Uma vez que a fibra muscular é excitada, a transmissão dessa excitação inicia-se com a geração de um potencial de ação o qual se propaga muito rapidamente pelo sarcolema e pelo sistema de túbulos-T. Uma rápida propagação do potencial de ação garante uma contração muscular mais uniforme. Essa contração envolve a liberação de Ca^{2+} que está diretamente ligado aos canais de Na^+ (voltagem dependentes) e K^+ (ATP dependentes) no sarcolema e nos túbulos-T (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008).

Repetidas contrações musculares têm sido associadas à indução da fadiga por causar maior influxo de Na^+ e o efluxo de K^+ da célula muscular. Esse efluxo de K^+ ocorre a cada potencial de ação, prejudicando a despolarização da fibra muscular por um acúmulo desse íon nos túbulos T e suas cisternas. Como consequência, há uma diminuição da força de contração muscular. Para evitar esse desequilíbrio entre Na^+ e K^+ intra e extracelular, a bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ trabalha bombeando K^+ para dentro da célula muscular (captando o K^+ também dos túbulos-T) e Na^+ para fora, permitindo que novos potenciais de ação se propaguem pelas fibras musculares e pelos túbulos-T para a liberação de Ca^{2+} e a contração muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008).

A fototerapia por LLLT e LEDT possivelmente pode influenciar a excitabilidade da fibra muscular e reduzir a fadiga muscular modulando indiretamente a bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ que é ATP dependente. As mitocôndrias circunvizinhas dos túbulos-T e das cisternas de Ca^{2+} possivelmente aumentam sua produção de ATP com a LLLT e LEDT. Assim, uma maior disponibilidade de ATP pode melhorar a função dessa bomba e prevenir o acúmulo de K^+ extracelular e reduzir a fadiga (NIELSEN e DE PAOLI, 2007; ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). Também, uma maior condutância dos canais de Cl^- nos túbulos-T é importante para reduzir o acúmulo de K^+ nesses túbulos e reestabelecer o potencial de membrana e a excitabilidade da fibra muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). Talvez os canais de Cl^- também sejam modulados pela radiação eletromagnética da LLLT e LEDT.

Os potenciais de ação que chegam às fibras musculares e provocam a sua despolarização podem ser identificados por EMG durante a contração muscular nos exercícios físicos (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; ENOKA, 2012). A utilização dessa ferramenta de avaliação pode ser de fundamental importância para elucidar possíveis efeitos da LLLT e LEDT sobre a junção neuromuscular, a excitabilidade da fibra muscular, a taxa de ativação e o recrutamento de unidades motoras, podendo inferir a magnitude da fadiga muscular. Nesse sentido, recentemente HIGASHI *et al.* (2013), TOMA *et al.* (2013) e DOS SANTOS MACIEL *et al.* (2014) utilizaram a eletromiografia de superfície para identificarem os efeitos da fototerapia sobre a redução da fadiga muscular. Até o momento não foi encontrado nenhum efeito da fototerapia sobre o sinal eletromiográfico.

3.7 Novas perspectivas

Distrofia muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchene (DMD) afeta 1 a cada 3.500 nascimentos vivos do gênero masculino. Os sintomas mais comuns nos primeiros anos de vida são alteração da marcha, hipertrofia da panturrilha e dificuldade para se levantar do solo entre 2 e 5 anos de idade (MANZUR e MUNTONI, 2009). A progressão do quadro clínico consiste na fraqueza generalizada dos músculos que provoca a dependência da criança a uma cadeira de rodas, insuficiência respiratória, cardiopatias e a morte no início da vida adulta (MANZUR e MUNTONI, 2009).

A DMD é uma doença letal, caracterizada por mutação no gene distrofina localizado no cromossomo Xp21 que conduz à severa redução ou a perda da proteína distrofina, a qual é responsável pela proteção do sarcolema contra o estresse mecânico de repetidas contrações musculares (MANZUR e MUNTONI, 2009; MARKERT *et al.*, 2011). Essa proteção consiste na indireta conexão entre o citoesqueleto da célula (actina e miofilamentos intermediários) com a matriz extracelular, evitando o dano e a degeneração das fibras musculares por transmissão de tensão gerada no processo contrátil (MANZUR e MUNTONI, 2009). O diagnóstico da doença geralmente se faz pela mensuração dos níveis séricos de CK, a qual tem seus níveis elevados em 10 a 100 vezes mais em crianças DMD comparadas às crianças sem DMD (MANZUR e MUNTONI, 2009).

A manifestação clínica da DMD consiste basicamente na destruição das células musculares e as consequentes incapacidades da fraqueza muscular (MARKERT *et al.*, 2011). Nesse processo existem 5 mecanismos descritos que influenciam e/ou agravam o quadro clínico de pacientes DMD (MARKERT *et al.*, 2011): (i) enfraquecimento

mecânico do sarcolema; (ii) inapropriado influxo de Ca^{2+} ; (iii) sinalização molecular específica; (iv) estresse oxidativo aumentado e (v) recorrente isquemia muscular.

(i) Enfraquecimento mecânico do sarcolema: a proteína distrofina é ligada a glicoproteínas para formar um complexo chamado distrofina-glicoproteína. Esse complexo tem a função de estabilizar mecanicamente o sarcolema durante os ciclos de encurtamento e alongamento da contração muscular, bem como também durante as contrações isométricas (MARKERT *et al.*, 2011);

(ii) Inapropriado influxo de Ca^{2+} : o influxo de Ca^{2+} deve ser controlado em todas as células para que se mantenha a homeostase. Um excesso de Ca^{2+} intracelular pode aumentar a atividade de proteases dependentes de Ca^{2+} , como a calpaína, e assim gerar maior dano e morte das células musculares (MARKERT *et al.*, 2011). Também, elevados níveis intracelulares de Ca^{2+} estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias, contribuindo para uma maior peroxidação lipídica da membrana das células, dano e morte das células musculares (MARKERT *et al.*, 2011). Esse processo gera maior inflamação e liberação de mais ROS no sítio de lesão e tecidos adjacentes que contribuem para aumentar a extensão da lesão primária, tornando-se um ciclo vicioso. Terapias que promovam um apropriado influxo de Ca^{2+} e função mitocondrial são fundamentais para diminuir os efeitos deletérios da DMD (MARKERT *et al.*, 2011).

(iii) sinalização molecular:

a) *interação muscular e sistema imune:* o gene NF- κ B regula a expressão de genes pró-inflamatórios e de atrofia muscular. Uma

super expressão desse gene promove uma resposta inflamatória exacerbada, com aumento de citocinas e quimiocinas na área distrófica, bem como aumento da resposta imune (leucócitos) (MARKERT *et al.*, 2011). A modulação desse gene parece ser importante para os pacientes DMD, controlando a degeneração e regeneração das fibras musculares (MARKERT *et al.*, 2011).

b) *células satélites*: Uma ausência ou uma diminuição de células satélites pode comprometer a regeneração muscular (MARKERT *et al.*, 2011). Devido ao grande ciclo de lesão-regeneração muscular, pacientes DMD diminuem essa população de células de forma significativa ao longo dos anos. Nesse processo, as células satélites desses pacientes possuem uma proliferação e diferenciação anormal que conduzem ao menor número de células de reposição e de células viáveis para a regeneração muscular (MARKERT *et al.*, 2011). Como consequência, há uma substituição do tecido muscular por tecido fibrótico ou ainda gorduroso que conduz à perda da função muscular (MARKERT *et al.*, 2011). Genes como Wnt e MyoD podem ser alvos de terapias que modulem a expressão de seus RNAs mensageiros, pois Wnt inibi a regeneração muscular via células satélites, e MyoD é responsável pela diferenciação das células satélites em mioblastos.

(iv) Estresse oxidativo aumentado: ROS e RNS podem lesar o sarcolema celular no processo de peroxidação lipídica. Também provoca a morte da célula muscular que gera inflamação e maior quantidade de ROS e RNS no tecido muscular distrófico (MARKERT *et al.*, 2011).

- (v) Recorrente isquemia muscular: pacientes DMD não possuem níveis normais de expressão do gene nNOS. Dessa maneira, durante as atividades físicas, esses pacientes não possuem um bom aporte sanguíneo nos músculos por um desequilíbrio entre os sinais adrenérgicos de vasoconstrição local e a vasodilatação mediada por NO, conduzindo à isquemia, intabilidade do sarcolema e dano tecidual (MARKERT *et al.*, 2011).

Existem poucos trabalhos na literatura científica que estudaram os efeitos da fototerapia por LLLT ou LEDT em pacientes DMD (ABDEL; ABDEL-MEGUID e KORRAA, 2007). Abdel-Meguid e Korraa (ABDEL; ABDEL-MEGUID e KORRAA, 2007) avaliaram o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e a apoptose celular de 30 pacientes DMD comparados a 20 pacientes sem DMD (controle). Os resultados revelaram que os pacientes DMD tiveram maior concentração de MDA e proteínas carboniladas no plasma sanguíneo (maior estresse oxidativo), maior apoptose celular (maior expressão gênica de Bax) e menores quantidades de óxido nítrico também no plasma sanguíneo. Após essas comparações, os autores irradiaram uma alíquota do sangue total dos pacientes DMD com LLLT (632,8 nm, 2,5 J/cm², 10 mW). Os resultados mostraram que a LLLT foi capaz de diminuir o estresse oxidativo (MDA e proteínas carboniladas), reduzir a apoptose celular (menor expressão de BAX) e aumentar a quantidade de óxido nítrico (ABDEL; ABDEL-MEGUID e KORRAA, 2007).

Com essa perspectiva sobre os efeitos da LLLT e LEDT sobre a distrofia muscular, Ferraresi e Parizotto estão conduzindo um estudo de caso sobre o uso da fototerapia em pacientes DMD. Esses autores têm observado melhora clínica na

qualidade de vida de um paciente DMD com 3 irradiações semanais de LEDT (arranjo de 50 LEDs, 850 nm, energia total de 60 J e potência total de 5 W) sobre o tronco (ventral e dorsal), braços e antebraços, coxas e pernas [Figura 7]. Houve um aumento nas atividades de vida diária, uma diminuição nos níveis sanguíneos de CK e menor dor e incidência de câibras musculares (dados não publicados).

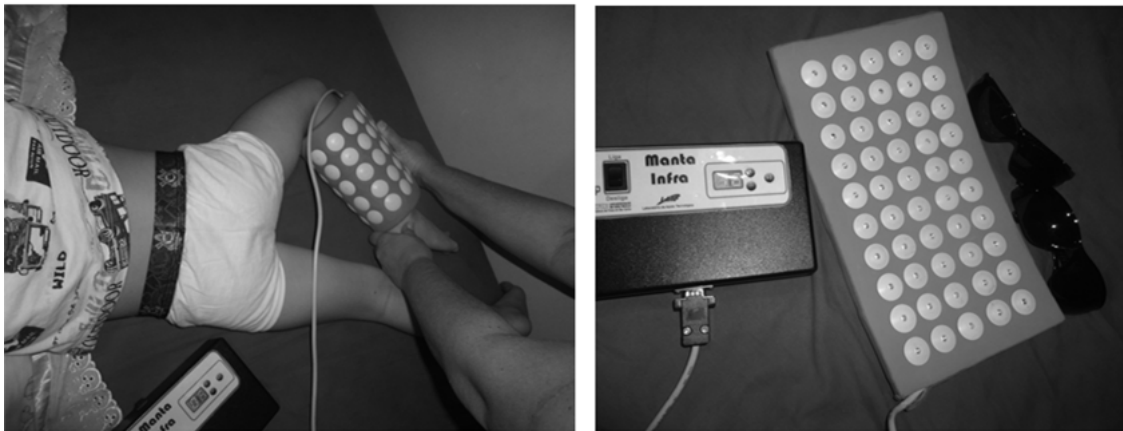


Figura 7. (FERRARESI e PARIZOTTO, 2013). Terapia por LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*) em paciente com Distrofia Muscular Duchenne (DMD).

Todos os efeitos e mecanismos de ação da LLLT e LEDT sobre a distrofia muscular ainda são incertos e temos poucas evidências científicas. Possivelmente a fototerapia pode auxiliar no tratamento dessa doença genética por mecanismos de ação como a modulação do (i) estresse oxidativo; (ii) influxo de Ca^{2+} ; (iii) inflamação; (iv) sinalização molecular: super expressão de genes relacionados à síntese proteica (mTOR), biogênese mitocondrial (PPARGC-1 α), vascularização (VEGF), genes relacionados à proliferação e diferenciação de células satélites; repressão de genes relacionados à inflamação (IL1- β e COX-2) e processos de atrofia muscular (NF-k β e MuRF1). Nesse sentido, recentemente LEAL-JUNIOR *et al.* (2014) verificaram em

modelo experimental para DMD (comundos mdx) que a LLLT comparada ao tratamento LLLT placebo, diminuiu significativamente a atrofia muscular, fibrose e níveis de CK sanguíneo; reduziu a expressão de marcadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL1- β , IL-6 e COX-2), assim como também diminuiu a IL-10 (citocina com ação anti-inflamatória) após 14 semanas de tratamento.

TEMA DE INTERESSE

Diante do exposto na revisão bibliográfica, o uso da fototerapia de baixa intensidade, representada nessa tese pelo uso da terapia laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy – LLLT*) e da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*), sobre o tecido muscular antes dos exercícios (pré-condicionamento) ou após (recuperação muscular) parece ser benéfico para o aumento de desempenho em diversos tipos de exercício, tanto em animais quanto em humanos. No entanto, os mecanismos de ação da fototerapia sobre o tecido muscular ainda não são completamente conhecidos e/ou compreendidos. Dessa maneira, os temas de interesse desta tese foram a investigação do tempo-resposta para a LEDT aumentar o metabolismo mitocondrial e síntese de ATP; o tempo-resposta para o pré-condicionamento muscular com a LEDT aumentar a resistência muscular à fadiga; o melhor momento para se aplicar a LEDT em programas de treinamento; efeitos moleculares (expressão gênica) da LLLT e LEDT sobre o tecido muscular humano; os efeitos da LEDT sobre a cinética do consumo de oxigênio e a aplicabilidade clínica da LEDT em atletas. É importante destacar que a identificação e elucidação dos mecanismos de ação investigados possivelmente são aplicáveis no tratamento de lesões teciduais e doenças, sobretudo musculares.

HISTÓRICO DA COMPOSIÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado é composta por 1 revisão bibliográfica e 8 artigos científicos originais.

O estudo I teve como objetivo analisar o tempo-resposta para a LEDT aumentar o potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP em miotubos formados a partir de células musculares de camundongos.

O estudo II teve como objetivo investigar o tempo-resposta para o pré-condicionamento com LEDT aumentar a síntese de ATP muscular e a resistência muscular à fadiga em camundongos submetidos a teste de fadiga.

No estudo III foi investigado qual é o melhor momento para o uso da LEDT em programa de treinamento de força em camundongos: antes, antes e após, ou somente após cada sessão de treinamento. Nesse estudo foi avaliado o desempenho muscular, síntese de ATP e glicogênio muscular, defesa contra o estresse oxidativo, proliferação de células musculares e o metabolismo mitocondrial.

O estudo IV contemplou a análise da expressão gênica global do tecido muscular de homens jovens submetidos a treinamento físico de força associado ao uso da LLLT após as sessões de treinamento. Nesse estudo foram analisados os efeitos da LLLT sobre a modulação da expressão de todo o genoma humano por meio de *microarrays*, permitindo a identificação de efeitos moleculares da LLLT sobre o exercício físico.

No estudo V, voluntários gêmeos idênticos foram submetidos a um programa de treinamento físico semelhante ao estudo IV, porém foram tratados com LEDT após cada sessão de treinamento. Nesse estudo foi avaliado o desempenho muscular, o volume muscular por meio de ressonância magnética nuclear e a expressão gênica do tecido

muscular dos voluntários para se identificar os efeitos moleculares da LEDT sobre o exercício físico.

O estudo VI investigou a aplicabilidade clínica do pré-condicionamento muscular com LEDT em atletas profissionais de voleibol na prevenção de dano muscular durante jogos oficiais da Superliga Brasileira de Voleibol Masculino.

O estudo VII investigou os efeitos do pré-condicionamento muscular com LEDT sobre a cinética do consumo de oxigênio em atleta maratonista.

Por fim, o estudo VIII investigou a cinética do consumo de oxigênio em homens jovens e não atletas após pré-condicionamento muscular com LEDT.

Para a consecução desses estudos, foi realizado dois estágios em instituições de ensino estrangeiras. O primeiro deles foi realizado no Massachusetts General Hospital – Harvard Medical School, por um período de 7 meses e financiamento parcial da FAPESP (processo BEPE 2012/05919-0). Nesse estágio foram realizados os estudos *in vitro* e *in vivo* desta tese, sob a orientação do prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto e prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e Supervisão do prof. Dr. Michael R. Hamblin.

O segundo estágio foi realizado na University of Waterloo por um período de 3 meses e financiamento parcial da FAPESP (processo 2010/07194-7 – reserva técnica). Na University of Waterloo foi investigado a cinética do consumo de oxigênio de homens jovens, não atletas, após o pré-condicionamento muscular com LEDT, sob a orientação do prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto e prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e Supervisão do prof. Dr. Richard L. Hughson. Além dos estágios nas instituições estrangeiras, foram realizadas parcerias entre os laboratórios da Universidade Federal de São Carlos, Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto,

Universidade de São Paulo – USP (Campus Ribeirão Preto e Campus São Carlos) e Equipe profissional de Voleibol Masculino.

Para a realização dos estudos *in vitro* e *in vivo*, foi utilizado um arranjo de LEDs especialmente construído para pesquisa pela Universidade de São Paulo – USP (Campus São Carlos) e pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Para a realização do estudo clínico sobre a modulação da expressão gênica global, foi utilizado um aparelho laser gentilmente cedido pela empresa DMC Equipamentos de São Carlos. Os estudos clínicos que realizaram o pré-condicionamento muscular com LEDT utilizaram um arranjo de LEDs construído pela Universidade de São Paulo – USP (Campus São Carlos) e pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

**Fototerapia de baixa intensidade aumenta o potencial de membrana
mitocondrial e a síntese de ATP em miotubos formados por células
musculares de camundongos (C2C12) com uma resposta pico entre 3-6 horas**

Artigo aceito para publicação no periódico *Photochemistry and Photobiology*

(ANEXO II)

RESUMO

A fototerapia de baixa intensidade utilizando lasers (*low-level laser therapy – LLLT*) e LEDs (*light-emitting diode therapy – LEDT*) tem sido utilizada antes dos exercícios para aumentar o desempenho muscular tanto em modelos experimentais quanto em estudos clínicos. No entanto, existe uma incerteza sobre qual é o melhor momento para usar a fototerapia antes do exercício. O mecanismo de ação da fototerapia é pensado ser a estimulação da respiração mitocondrial nos músculos e o aumento da síntese de adenosina trifosfato (ATP) necessário para a realização do exercício. O objetivo desse estudo foi investigar o tempo necessário para o aumento do potencial de membrana mitocondrial (MMP) e síntese de ATP em miotubos formados a partir de células musculares de camundongos (C2C12) expostos à terapia LED (LEDT). Para a LEDT foi utilizado um arranjo de 20 LEDs na faixa do vermelho (630 ± 10 nm, 25 mW) e 20 LEDs na faixa do infravermelho próximo (850 ± 10 nm, 50 mW) irradiando 28 mW/cm^2 durante 90 seg ($2,5 \text{ J/cm}^2$) com análises em 5 minutos, 3 horas, 6 horas e 24 horas após a LEDT. A LEDT-6h teve o maior MMP, seguido do grupo LEDT-3h, LEDT-24h, LEDT-5min e Controle com significativas diferenças. Essa mesma ordem de resposta foi observada para a quantidade de ATP ($6\text{h} > 3\text{h} > 24\text{h} > 5\text{min} > \text{Controle}$) com significativas diferenças. Foi encontrada uma forte correlação ($r = 0,89$) entre MMP e ATP. Esses resultados sugerem uma janela de tempo ideal entre 3-6 horas para a LEDT estimular as células musculares.

Palavras-chave: *Light-emitting diode therapy*, ATP, potencial de membrana mitocondrial, tempo-resposta.

INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de energia nas células e por essa razão tem um importante papel na função celular e manutenção da homeostase. Essa organela tem uma intrigante e bem desenhada arquitetura para sintetizar adenosina trifosfato (ATP) que é a fonte básica de energia para todas as atividades celulares (KARU, 1999; PERRY *et al.*, 2011).

Mitocôndrias contém uma cadeia respiratória e transportadora de elétrons (CTE) capaz de transferir esses elétrons através dos complexos I, II, III e IV por meio de várias reações de óxido redução em conjunto com um bombeamento de íons hidrogênio (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Estes processos geram água metabólica como o produto final, uma vez que o oxigênio é o acceptor final dos elétrons da CTE, a qual é acoplada à síntese de ATP quando os íons H^+ voltam para a matriz mitocondrial através do complexo V (ATP sintase), completando assim a CTE. Mudanças no fluxo de elétrons através da CTE e conseqüentemente no bombeamento de íons H^+ produzem significativa modulação na força próton motriz total e na síntese de ATP. Essas mudanças podem ser mensuradas por meio do potencial de membrana mitocondrial (MMP) e conteúdo de ATP (PERRY *et al.*, 2011).

Desde a primeira evidência que a fototerapia, utilizando laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy – LLLT*), pôde aumentar a síntese de ATP (PASSARELLA *et al.*, 1984; KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995), muitos mecanismos de ação têm sido propostos para explicar os efeitos dessa terapia sobre as mitocôndrias. Um dos primeiros estudos reportou um aumento no MMP e na síntese de ATP mensurados no intervalo de 3 minutos após a irradiação por LLLT (PASSARELLA *et al.*, 1984). Anos mais tarde, outros autores estenderam o tempo para

a quantificação do ATP “extra” induzido pela LLLT em células de câncer cervical humano (HeLa) (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995). Com intervalos de 5 a 45 minutos, esses autores não encontraram nenhuma mudança na síntese de ATP durante os primeiros 15 minutos após a irradiação com LLLT, porém, após 20-25 minutos os níveis de ATP aumentaram agudamente e então retornaram aos valores basais em 45 minutos (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995).

Mais recentemente outros estudos têm relatado efeitos da fototerapia sobre as mitocôndrias em diferentes tipos de células (ORON *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2008; GIULIANI *et al.*, 2009; HOURELD; MASHA e ABRAHAMSE, 2012; MASHA; HOURELD e ABRAHAMSE, 2013). Em células neurais a LLLT parece também aumentar o MMP, proteger contra o estresse oxidativo (GIULIANI *et al.*, 2009) e aumentar a síntese de ATP em células intactas (sem agentes estressores) (ORON *et al.*, 2007). Em mitocôndrias de células de fibroblastos sem agentes estressores, a LLLT também aumentou a síntese de ATP e a atividade do complexo IV mitocondrial com uma dose-resposta (HOURELD; MASHA e ABRAHAMSE, 2012). Em miotubos formados a partir de células musculares de camundongos (C2C12), a LLLT modulou a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a função mitocondrial também com uma dose-resposta em células intactas ou em células estressadas por estimulação elétrica (XU *et al.*, 2008).

Aumentos no metabolismo mitocondrial e na síntese de ATP têm sido propostos por muitos autores como hipóteses para explicar os efeitos da fototerapia, tanto por lasers (LLLT) e LEDs (*light-emitting diode therapy – LEDT*), sobre o desempenho muscular quando usada no pré-condicionamento muscular, ou quando utilizada para a recuperação muscular após os exercícios (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO,

2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). No entanto, existe uma lacuna na literatura referente a estudos que identificaram os efeitos imediatos e em longo prazo da fototerapia sobre o metabolismo mitocondrial e síntese de ATP em células de músculo esquelético que por sua vez poderiam confirmar essas hipóteses.

Esse presente estudo teve como objetivo identificar o tempo-resposta para a fototerapia por LEDs (LEDT) modular o MMP e o conteúdo de ATP em miotubos formado por células musculares de camundongos (C2C12) sem a influência de agentes estressores, apenas sob o estresse da cultura celular. Além disso, o segundo objetivo desse estudo foi correlacionar o MMP com o conteúdo de ATP dentro de um intervalo de tempo de 5 minutos a 24 horas após a LEDT. Tivemos como meta encontrar o melhor tempo-resposta para a LEDT, o qual pode ser útil em futuros estudos experimentais e clínicos que investiguem o pré-condicionamento muscular, recuperação muscular pós-exercício ou qualquer outra fotobiomodulação em tecido muscular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular

As células musculares (C2C12) foram gentilmente fornecidas pela Divisão Cardiovascular do *Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, USA*. As células foram cultivadas em meio de cultura (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Sigma-Aldrich) com soro fetal bovino (20% FBS - Sigma-Aldrich) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) em incubador umidificado a 37 °C e 5% CO₂.

As células foram cultivadas e um total de $1,71 \times 10^5$ de células aproximadamente foram contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, essas células

foram distribuídas igualmente dentro de 30 poços (aproximadamente $5,7 \times 10^3$ células por poço) dentro de duas diferentes microplacas:

- 15 poços em microplaca com paredes na cor preta e fundo transparente (Costar[®] 96-Well Black Clear-Bottom Plates) para análises de MMP.
- 15 poços em microplaca com paredes na cor branca e fundo transparente (Costar[®] 96-Well White Clear-Bottom Plates) para análises de síntese de ATP.

Além disso, ambas as microplacas foram subdivididas em 5 colunas com 3 poços por coluna (triplicata):

- Controle: sem irradiação por LEDT sobre as células.
- LEDT-5min: LEDT aplicado sobre as células e avaliações de ATP e MMP após 5 minutos.
- LEDT-3h: LEDT aplicado sobre as células e avaliações de ATP e MMP após 3 horas.
- LEDT-6h: LEDT aplicado sobre as células e avaliações de ATP e MMP após 6 horas.
- LEDT-24h: LEDT aplicado sobre as células e avaliações de ATP e MMP após 24 horas.

Após colocar as células (C2C12) nos poços das microplacas, as células foram cultivadas por nove dias em meio de cultura (DMEM) contendo 2% de soro equino inativado por calor (*heat-inactivated horse serum* – Sigma-Aldrich) em incubador umidificado a 37 °C e 5% de CO₂ para induzir a diferenciação celular em miotubos, como descrito em estudo prévio (XU *et al.*, 2008). No 10º dia, o grupo LEDT-24h foi irradiado com LEDT. No 11º dia todos os grupos remanescentes receberam a LEDT e

foram avaliados quanto aos conteúdos de ATP e MMP em tempos específicos de acordo com cada grupo.

Terapia LED (light-emitting diode therapy – LEDT)

Foi usado nesse estudo um arranjo de 40 LEDs (20 vermelhos – 630 ± 10 nm; 20 infravermelhos – 850 ± 20 nm) com um diâmetro de 76 mm. Esse arranjo de LEDs foi posicionado a uma distância de 156 mm a partir do topo de cada microplaca e a irradiação durou 90 segundos com os parâmetros fixos e descritos na tabela 1. Cada grupo de poços recebeu a LEDT individualmente, e todos os outros poços de cada microplaca (grupos) foram cobertos com uma folha de alumínio para evitar a irradiação por luz [Figure 1]. Os parâmetros da LEDT foram mensurados e calibrados com um medidor de potência óptica PM100D Thorlabs® e sensor S142C (area de $1,13 \text{ cm}^2$). Além disso, foi escolhido a utilização da fototerapia com luz vermelha e infravermelha ao mesmo tempo a fim de promover uma dupla banda de absorção pela citocromo c oxidase (Cox) se baseando nas suas específicas bandas de absorção relatadas previamente (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010). A temperatura ambiente foi controlada ($22\text{-}23 \text{ }^\circ\text{C}$) durante a irradiação com LEDT, a qual não aumentou a temperatura mais que $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ sobre a superfície das microplacas utilizadas nesse estudo. Esse incremento de $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ foi dissipado para o ambiente antes de 2 minutos após a LEDT.

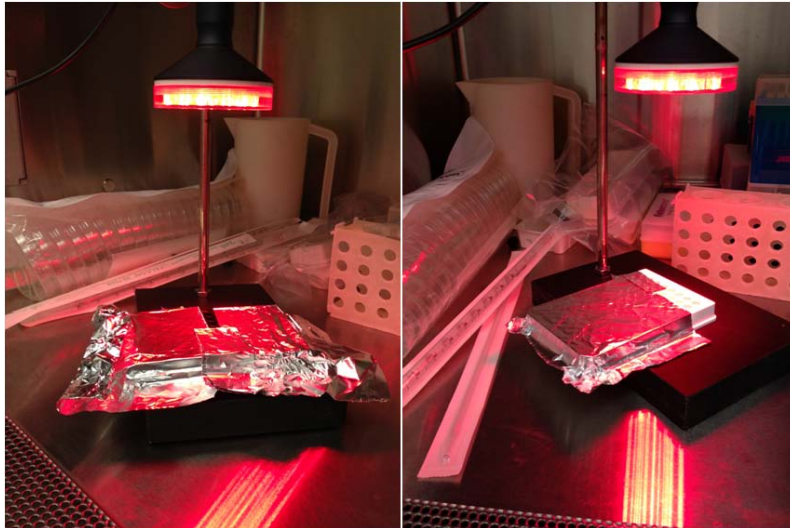


Figura 1 – Miotubos formados a partir de células musculares de camundongos (C2C12). Aparato experimental para a irradiação das microplacas branca e preta contendo os miotubos formados a partir de células musculares (C2C12) usando a terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT) sem contato.

Tabela 1. Todos os parâmetros da terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT). Grupo Controle não recebeu a LEDT.

Número de LEDs (arranjo): 40 (20 infravermelho-IR e 20 vermelho-RED)
Comprimento de onda: 850 nm (IR) and 630 nm (RED)
Área de cada LED: 0,2 cm ²
Frequência de pulso: contínuo
Potência óptica de cada LED: 50 mW (IR) e 25 mW (RED)
Potência óptica (arranjo): 1.000 mW (IR) e 500 mW (RED)
Tamanho do arranjo de LEDs: 45 cm ²
Densidade de potência (no topo de cada microplaca): 28 mW/cm ²
Tempo de tratamento: 90 seg
Densidade de energia (no topo de cada microplaca): 2,5 J/cm ²
Modo de aplicação: sem contato
Distância à microplaca ou ao medidor de potência óptica: 156 mm

Análise do potencial de membrana mitocondrial (MMP)

Essa análise foi realizada usando as células da microplaca de parede na cor preta. MMP foi avaliado usando *tetramethyl rhodamine methyl ester* (TMRM –

Invitrogen/ Molecular Probes) na concentração final de 25 nM. Os núcleos dos miotubos formados a partir das células C2C12 foram marcados usando *Hoechst* (Sigma-Aldrich) na concentração de 1mg/ ml. Cada poço da microplaca foi incubado por 30 minutos, a 37 °C e 5% de CO₂ com 100 µl de solução contendo TMRM e *Hoechst*. Em seguida, essa solução foi cuidadosamente removida de cada poço e adicionado 100 µl de solução tampão contendo HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution* – Life Technologies Corporation) e 15 mM de HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* – Life Technologies Corporation). Os miotubos foram fotografados em microscópio confocal (Olympus America Inc. Center Valley, PA, USA) usando uma excitação a 559 nm e emissão a 610 nm. Três campos aleatórios de cada poço foram fotografados com uma ampliação de 40x com as lentes do microscópio imersas em água. As imagens foram exportadas e a fluorescência da incorporação de TMRM dentro da matriz mitocondrial foi mensurada usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD).

Análise de adenosina trifosfato (ATP)

Essa análise foi realizada usando as células da microplaca de parede branca. Primeiramente, o meio de cultura foi removido cuidadosamente de cada poço, seguindo da adição de 50 µl/poço de *CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay reagent* (Promega). Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente (25 °C), os sinais de luminescência foram mensurados em *SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Reader* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com tempo de integração de 5 segundos para aumentar baixos sinais (KHAN, 2003). Uma curva padrão foi preparada usando *ATP standard* (Sigma) de acordo com o manual de instruções do fabricante e então a concentração de ATP foi calculada em nanomol (nmol) por poço.

Coefficiente de correlação ou produto-momento de Pearson

A correlação entre TMRM e o conteúdo de ATP nos miotubos formados a partir de células C2C12 foi calculada usando o índice r de Pearson. Os valores do índice r foram interpretados como recomendado previamente (WEBER e LAMB, 1970): 0,00–0,19 = nenhuma ou leve; 0,20–0,39 = baixa; 0,40–0,69 = moderada; 0,70–0,89 = alta ou forte; e 0,90–1,00 = muito alta ou muito forte.

Cálculo amostral

O tamanho amostral foi calculado baseado nas diferenças significativas entre todos os grupos referentes aos conteúdos de ATP. O poder estatístico de 80% e um tamanho de efeito grande (acima de 0,75) foram estabelecidos como satisfatórios.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk's W verificou a normalidade da distribuição dos dados. ATP e TMRM foram comparados entre os grupos usando a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD. Foi conduzida uma análise de correlação entre TMRM e ATP usando o coeficiente de correlação ou o produto-momento de Pearson. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Potencial de membrana mitocondrial (TMRM)

O grupo LEDT-6h aumentou o MMP (10,77 UA; Erro padrão da média – EP 0,88) comparado aos grupos: Controle (3,79 UA; EP 0,46; $P < 0,001$); LEDT-5min

(4,11 UA; EP 0,52; $P < 0,001$); LEDT-24h (4,91 UA; EP 0,47; $P = 0,001$). LEDT-3h (7,87 UA; EP 0,59) aumentou o MMP comparado ao grupo Controle ($P = 0,019$) e LEDT-5min ($P = 0,031$). Esses resultados foram apresentados graficamente na figura 2. Todos os resultados não significativos foram Controle *versus* LEDT-5min ($P = 0,997$) e *versus* LEDT-24h ($P = 0,816$); LEDT-5min *versus* LEDT-24h ($P = 0,935$); LEDT-3h *versus* LEDT-6h ($P = 0,113$) e *versus* LEDT-24h ($P = 0,103$). UA é unidade arbitrária mensurada com o software Image J.

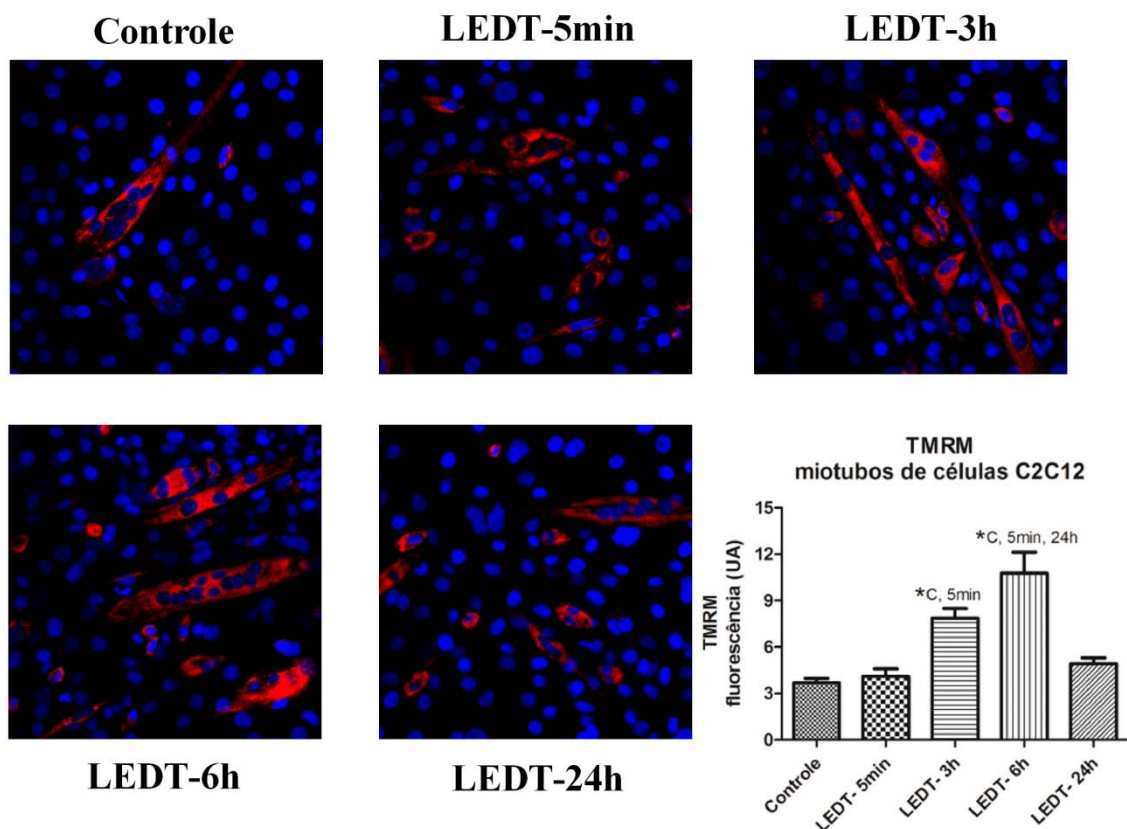


Figura 2 – TMRM. Análise do potencial de membrana mitocondrial usando *tetramethyl rhodamine methyl ester* (TMRM) marcado em vermelho. Imagens com ampliação de 40x. Siglas: Terapia LED= LEDT (*light-emitting diode therapy*); UA= unidade arbitrária; C= grupo controle; 5min= grupo LEDT-5min; 24h= grupo LEDT-24h; *= significância estatística ($P < 0,05$) usando análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

ATP

O grupo LEDT-6h aumentou o conteúdo de ATP (4,53 nmol/ poço, EP 0,19) comparado aos grupos: Controle (1,28 nmol/ poço, EP 0,05; $P < 0,001$); LEDT-5min (2,01 nmol/ poço, EP 0,16; $P < 0,001$) e LEDT-24h (2,77 nmol/ poço; EP 0,16; $P = 0,007$). O grupo LEDT-3h aumentou o conteúdo de ATP (3,73 nmol/ poço; EP 0,17) comparado aos grupos Controle ($P < 0,001$) e LEDT-5min ($P = 0,008$). O grupo LEDT-24h aumentou o conteúdo de ATP comparado ao grupo Controle ($P = 0,020$). Esses resultados são apresentados graficamente na figura 3A. Todos os resultados não significantes foram entre o grupo Controle *versus* LEDT-5min ($P = 0,385$); LEDT-3h *versus* LEDT-6h ($P = 0,299$) e *versus* LEDT-24h ($P = 0,169$); LEDT-24h *versus* LEDT-5min ($P = 0,338$).

Tamanho amostral

O poder estatístico e tamanho do efeito sobre o conteúdo de ATP em todos os grupos foi calculado a fim de assegurar um poder estatístico mínimo de 80% e um grande tamanho do efeito (superior a 0,75). Usamos a média dos conteúdos de ATP de cada grupo e o maior valor de desvio padrão entre todos os grupos, que foi observado para o grupo LEDT-6h. Nossos resultados demonstram uma diferença entre os grupos com um poder estatístico de 99%, e um tamanho de efeito de 3,42 (efeito muito grande) e tamanho amostral de 10, ou seja, 2 poços por grupo (5 grupos). Estes cálculos demonstram que o tamanho da amostra foi pequeno, mas adequado em nosso estudo (3 poços por grupo).

Coeficiente de correlação ou produto-momento de Pearson

A incorporação de TMRM dentro da matriz mitocondrial dos miotubos formados a partir de células musculares (C2C12) mostrou uma forte correlação ($r = 0,89$) com o conteúdo de ATP ($P < 0,001$). Esse resultado é apresentado na figura 3B.

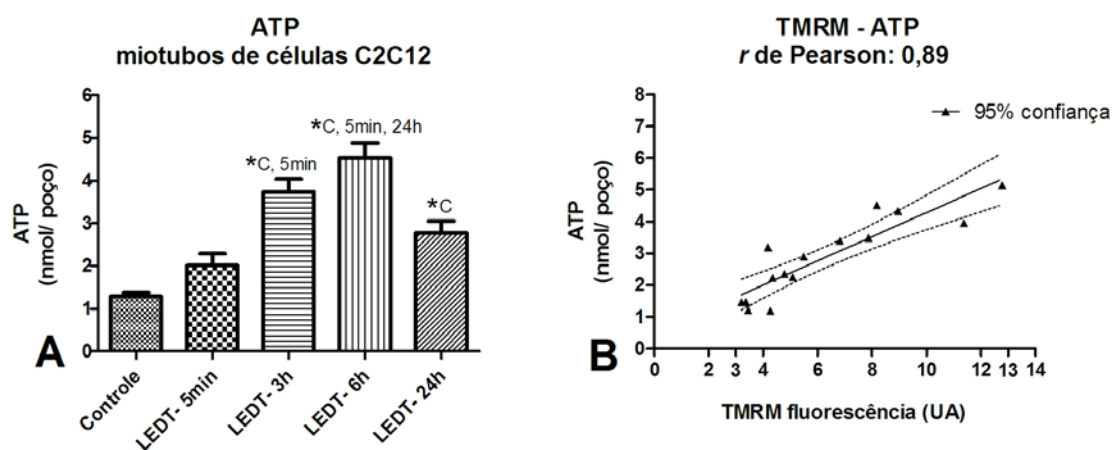


Figura 3 – ATP e coeficiente de correlação de Pearson (r). **A)** Análise do conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) entre os grupos. **B)** Coeficiente de correlação de Pearson (índice r) entre ATP e o potencial de membrana mitocondrial usando TMRM. Siglas: LEDT= Terapia LED (*light-emitting diode therapy*); TMRM= *tetramethyl rhodamine methyl ester*; nmol= nanomol; UA= unidade arbitrária; C= grupo controle; 5min= grupo LEDT-5min; 24h= grupo LEDT-24h; *= significância estatística ($P < 0,05$) usando análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

DISCUSSÃO

Esse presente estudo identificou um tempo-resposta bem definido para a terapia LED (LEDT) aumentar o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e síntese de ATP em miotubos formados a partir de células musculares de camundongos (C2C12) sob o estresse de cultura celular. A dose de luz aplicada nesse estudo foi baseada em estudo prévio que já reportou efeitos benéficos da fototerapia por laser (LLLT) sobre as

mitocôndrias de miotubos (XU *et al.*, 2008). Além disso, nós encontramos uma forte correlação entre MMP e os conteúdos de ATP mensurados durante um amplo tempo que foi de 5 minutos (efeitos imediatos) até 24h (efeitos prolongados). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo investigando o tempo-resposta para a fototerapia modular o metabolismo mitocondrial em conjunto com a síntese de ATP em células musculares.

As células musculares C2C12 pertencem a uma linhagem de células originalmente isoladas de músculos distróficos de comundongos C3H por YAFFE e SAXEL (1977). Em cultura, essas células se diferenciam rapidamente em miotubos contráteis (fibras musculares) especialmente quando tratadas com soro equino ao invés de soro fetal bovino. Esses miotubos contêm células multinucleadas que expressam proteínas características de músculo esquelético como cadeia pesada de miosina e creatina quinase (TANNU *et al.*, 2004).

Um dos primeiros efeitos da fototerapia reportados na literatura foi a modulação do potencial de membrana mitocondrial (MMP) e síntese de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (PASSARELLA *et al.*, 1984) e em células cancerosas (HeLa) (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995). Nossos resultados estão de acordo com esses estudos, mostrando um aumento do MMP e síntese de ATP em miotubos formados a partir de células C2C12. No entanto, a fototerapia parece produzir um tempo-resposta diferente para o MMP e a síntese de ATP entre os diferentes tipos de células. Enquanto as células do tipo HeLa mostraram um pico de síntese de ATP por volta de 20 minutos após a fototerapia (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995), as mitocôndrias de fígado mostraram um imediato aumento no MMP e na síntese de ATP (PASSARELLA *et al.*, 1984). No presente estudo nós identificamos que as células

musculares necessitam de um tempo maior, em torno de 3h a 6h, para produzirem o máximo efeito da fototerapia, convertendo a energia luminosa em significantes aumentos no MMP e na síntese de ATP, compreendendo um aumento em torno de 200% a 350% sobre os valores normais (controle). Além disso, nós encontramos que 24h após a irradiação com LEDT, os miotubos podem ainda produzirem significativamente mais ATP comparado ao grupo Controle enquanto o grupo LEDT-5min não mostrou significativas diferenças.

A citocromo c oxidase (Cox) tem sido reportada como o principal cromóforo em células expostas a fototerapia na faixa do vermelho e infravermelho próximo (KARU, 1999; KARU, 2008; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010). No entanto, apesar da Cox ser importante nos efeitos imediatos da absorção dos fótons, a mensuração de sua atividade pode ser insuficiente para confirmar se a fototerapia pode induzir uma síntese de ATP “extra”. Por essa razão, a avaliação do MMP associado à análise de síntese de ATP podem fornecer informações sobre a rapidez que ocorrem as modulações na cadeia transportadora de elétrons (CTE), e no bombeamento de íons H⁺ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, assim como o quanto os íons H⁺ estão retornando para a matriz mitocondrial (PERRY *et al.*, 2011). Nessa perspectiva, nossos resultados são consistentes com os achados de XU *et al.* (2008) que reportaram nenhum efeito imediato da fototerapia por laser (LLLT) sobre o MMP. Além disso, apesar de XU *et al.* (2008) não avaliar o conteúdo de ATP, nossos resultados mostraram nenhuma resposta significativa para incrementos de ATP imediatamente após a fototerapia por LEDs (LEDT) comparado ao grupo Controle.

Os nossos resultados para MMP em conjunto com o conteúdo de ATP teve uma forte correlação (coeficiente de Pearson, $r = 0,89$) durante o tempo de investigação

nesse estudo que foi de 5 minutos a 24 horas, sugerindo uma linear e positiva dependência da síntese de ATP e MMP (CTE e bombeamento de íons H^+) nas células musculares, sugerindo um novo e mais eficiente tempo-resposta ou janela de tempo para a LEDT estimular as células musculares (ver figura 4A e 4B). Esses resultados são muito importantes para a recuperação muscular após exercício (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013) pois sugerem um efeito prolongado da fototerapia sobre a síntese de ATP necessária para reparar o dano muscular. Também, o pré-condicionamento muscular usando a fototerapia para a melhora do desempenho antes de uma sessão de exercício (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013) possivelmente poderia ser otimizado pelo uso do tempo-resposta encontrado nesse presente estudo. No entanto, mais estudos *in vivo* e clínicos são necessários para confirmar nossas hipóteses.

O pré-condicionamento muscular usando laser (LLLT) ou LEDs (LEDT) tem sido mostrado na literatura como uma abordagem terapêutica para melhorar o desempenho muscular tanto em estudo experimentais (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; SANTOS *et al.*, 2014) quanto em estudos clínicos (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). No entanto, apesar dessa melhora relatada na literatura ser significativa, alguns estudos não encontraram efeitos positivos (HIGASHI *et al.*, 2013). Além disso, as diferenças entre os grupos tratados com a fototerapia ou placebo têm sido não muito grande. Essas diferenças reportadas na literatura em modelos experimentais variaram entre 80% a 150% dos valores encontrados para os grupos controle em testes de fadiga induzidos por estimulação elétrica (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; SANTOS *et al.*, 2014). Em estudos clínicos, essas diferenças variaram entre 5% a 57% no aumento de repetições e máxima contração voluntária (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Possivelmente esses aumentos

relativamente modestos poderiam ser devido a um insuficiente tempo necessário para as células musculares converterem a luz da fototerapia em respostas biológicas como as identificadas em nosso estudo para o MMP e a síntese de ATP. Conseqüentemente, os protocolos para o pré-condicionamento muscular que têm sido realizados até o presente momento (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014), ou seja, geralmente aplicando a fototerapia 5 minutos antes do exercício, possivelmente podem não alcançarem os melhores resultados. Baseado em nossos resultados, nós sugerimos esperar de 3h a 6h após a aplicação da fototerapia sobre os músculos para se obter o melhor aumento de desempenho muscular no regime de pré-condicionamento, uma vez que MMP e a disponibilidade de ATP são importantes para o desempenho muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; FERRARESI *et al.*, 2011). Uma vez mais, nós gostaríamos de destacar a necessidade de mais estudos *in vivo* e clínicos para confirmar nossas hipóteses. Nesse momento, é importante fazer menção a dois estudos prévios que tiveram uma iniciativa similar (HAYWORTH *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE-PONTES *et al.*, 2014). HAYWORTH *et al.* (2010) encontram aumentos na atividade da Cox 24h após a aplicação de LEDT sobre os músculos de ratos; ALBUQUERQUE-PONTES *et al.* (2014) encontraram uma dependência do tempo, comprimento de onda e da dose de luz aplicada sobre os músculos de ratos para a Cox aumentar a sua atividade. Ambos os estudos usaram animais sem qualquer tipo de estresse, assim como o presente estudo utilizou células musculares somente sob o estresse da cultura celular. Para o nosso entendimento, esses estudos prévios, combinados aos nossos resultados, são extremamente valiosos na descoberta e entendimento dos mecanismos de ação da fototerapia sobre o tecido muscular, guiando para um melhor uso futuro da fototerapia por laser e LEDs na prática clínica.

O nosso estudo foi desenhado para testar uma dose de luz durante uma janela de tempo para mostrar que há uma dependência do tempo para a fototerapia produzir efeitos secundários nas células musculares. Por essa razão, esse presente estudo usou uma dose de luz constante (fluência) reportada em estudo prévio (XU *et al.*, 2008), bem como uma constante densidade de potência (irradiância). Uma vez que há uma possível dose-resposta bifásica (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011), o uso de diferentes parâmetros como fluência, comprimento de onda ou irradiância podem produzir diferentes respostas. Além disso, os comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho próximo foram aplicados ao mesmo tempo a fim de obter vantagem sobre as duplas bandas que a Cox possui para a absorção da luz da fototerapia (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010).

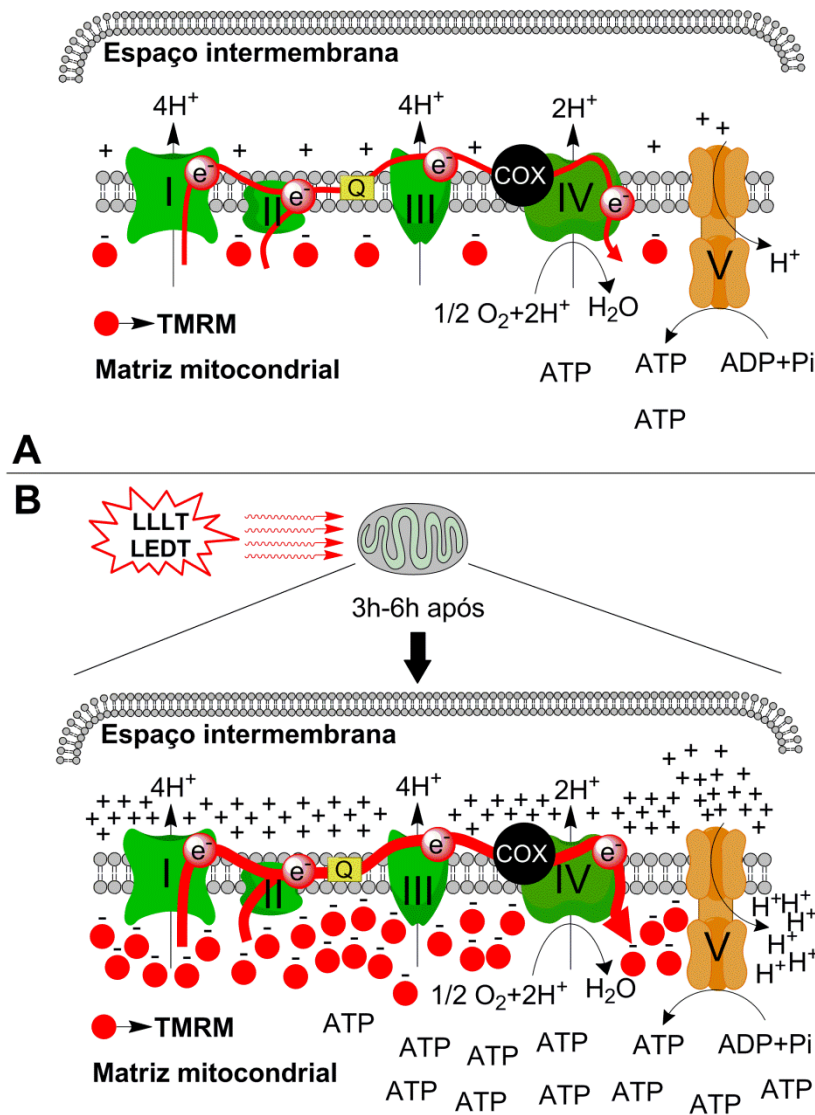


Figura 4 – Mecanismo de ação da LEDT sobre a mitocôndria. **A)** Mitocôndrias de miotubos formados de células musculares de camundongos (C2C12) sem os efeitos da fototerapia por laser (*low-level laser therapy* – *LLLT*) ou LEDs (*light-emitting diode therapy* – *LEDT*). Há um fluxo normal de elétrons (seta vermelha) através de todos os complexos da cadeia transportadora de elétrons; um bombeamento normal de íons H⁺; síntese de ATP normal e uma modesta incorporação de TMRM pela matriz mitocondrial. **B)** Mitocôndrias de miotubos formados de células musculares de camundongos (C2C12) após 3 a 6 horas da aplicação de LEDT. Há um aumento no fluxo de elétrons (seta vermelha mais grossa); aumento no bombeamento de íons H⁺, na síntese de ATP e uma maior incorporação de TMRM pela matriz mitocondrial. Siglas: I, II, III, IV e V= complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial; H⁺= próton de hidrogênio; - = elétron de hidrogênio; O₂= oxigênio; H₂O= água metabólica; Q= quinona; Cox= citocromo c oxidase; ATP= adenosina trifosfato; ADP= adenosina difosfato; Pi= fosfato inorgânico; TMRM= *tetramethyl rhodamine methyl ester*.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo relatando os benefícios fototerapia usando dois comprimentos de onda (luz vermelha e infravermelha próxima) sobre o potencial de membrana mitocondrial (MMP) em conjunto com a síntese de ATP em miotubos de células musculares de camundongos (C2C12). Além disso, foi encontrado um tempo-resposta bem definido para o aumento da síntese de ATP mediado pelo aumento do MMP pela fototerapia em miotubos.

Os nossos resultados sugerem que 3h a 6h pode ser o melhor tempo-resposta para a fototerapia melhorar o metabolismo muscular. Também, os nossos resultados nos conduz a pensar que pode haver, talvez, efeitos acumulativos se a fototerapia for aplicada em intervalos menores que 24h e isto pode ser relevante clinicamente quando a fototerapia, tanto por laser e LEDs, for utilizada para a recuperação muscular pós-exercício. Finalmente, nós acreditamos que o uso da fototerapia para o pré-condicionamento muscular poderia ser otimizado em futuros estudos se o tempo-resposta para o aumento de ATP e MMP encontrados nesse estudo forem levados em consideração.

**Tempo-resposta para o aumento de ATP e resistência à fadiga muscular
após a fototerapia em camundongos**

Artigo submetido ao periódico *Lasers in Medical Science*

(ANEXO III)

RESUMO

Recentemente a fototerapia de baixa intensidade tem sido usada para aumentar o desempenho muscular nos exercícios. No entanto, há uma falta de compreensão do tempo-resposta dos músculos para essa terapia. O primeiro objetivo deste estudo foi determinar o tempo-resposta para a fototerapia, usando a terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT), aumentar o conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) nos músculos sóleo e gastrocnêmio em camundongos. O segundo objetivo foi testar se a LEDT pode aumentar a resistência muscular à fadiga durante exercício intenso. Cinquenta camundongos machos Balb/c foram randomicamente alocados em 2 grupos iguais: LEDT-ATP e LEDT-Fadiga. Ambos os grupos foram subdivididos em 5 grupos iguais: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. A quantidade de ATP muscular ou a resistência à fadiga foi analisada em cada subgrupo após a irradiação por LEDT em tempos específicos. O teste de fadiga foi realizado pelos camundongos do grupo LEDT-Fadiga, os quais escalaram uma escada inclinada, carregando uma carga referente a 150% de sua massa corporal repetidas vezes até a exaustão. A LEDT usou um arranjo de 20 LEDs na faixa do vermelho (630 ± 10 nm, 25 mW) e 20 LEDs na faixa do infravermelho (850 ± 20 nm, 50 mW) aplicando 80 mW/cm^2 durante 90 segundos ($7,2 \text{ J/cm}^2$) sobre as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas. A LEDT-6h foi o subgrupo com a maior quantidade de ATP nos músculos sóleo e gastrocnêmio comparado a todos os demais subgrupos ($P < 0,001$). Também, os animais do subgrupo LEDT-6h realizaram mais repetições no teste de fadiga ($P < 0,001$) comparado a todos os demais subgrupos: LEDT-Placebo e LEDT-5min (~600%); LEDT-3h (~200%) e LEDT-24h (~300%). Foi estabelecida uma alta correlação entre o número de repetições (escaladas) no teste de fadiga e o conteúdo de ATP nos músculos sóleo ($r = 0,84$) e gastrocnêmio ($r = 0,94$). A LEDT aumentou o

conteúdo de ATP nos músculos e a resistência à fadiga em camundongos com uma resposta pico em 6 horas. Apesar do tempo-resposta para a LEDT em camundongos e em humanos possivelmente não ser o mesmo, atletas podem considerar aplicar a LEDT 6 horas antes de uma competição.

Palavras-chave: LEDT, ATP muscular, fotobiomodulação, tempo-resposta, fadiga.

INTRODUÇÃO

A fototerapia de baixa intensidade usa a luz na faixa do visível ou infravermelho próximo para produzir uma fotobiomodulação nos tecidos biológicos, estimulando ou inibindo respostas biológicas que dependem da dose de luz aplicada. Desde 1967, essa terapia tem sido utilizada para diversas aplicações na medicina com no tratamento de inflamação, dor ou acelerar a cicatrização dos tecidos (ENWEMEKA *et al.*, 2004; CHOW *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011). A fototerapia pode ser aplicada por diodos de lasers (*low-level laser therapy – LLLT*), LEDs (*light-emitting diode therapy – LEDT*) ou outras fontes de luz com específicos comprimentos de onda (“cores”) (HUANG *et al.*, 2011).

Muitos pesquisadores têm investigado o mecanismo pelo qual a fototerapia interage com os tecidos biológicos para produzir o fenômeno da fotobiomodulação (KARU, 1999; VLADIMIROV; OSIPOV e KLEBANOV, 2004; HUANG *et al.*, 2009). Um dos primeiros estudos publicados na literatura relata a formação de “mitocôndrias gigantes” após o uso da fototerapia (BAKEEVA *et al.*, 1993). Muitos estudos descobriram moléculas dentro das células (chamadas cromóforos) que podem absorver a luz produzindo modulações no metabolismo celular (KARU, 1999). Entre essas moléculas, a citocromo c oxidase (Cox), que está no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, tem recebido atenção especial (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010).

Recentemente HAYWORTH *et al.* (2010) usou um arranjo de LEDs na faixa do vermelho (660 nm) para aumentar a atividade da Cox 24 horas após aplicarem a fototerapia sem contato sobre músculos de ratos. Esses autores relataram diferenças na atividade da Cox que dependeram do tipo de fibra muscular.

O aumento na atividade da Cox é supostamente responsável por estimular a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (KARU, 1999). KARU (1999) reportou muitos anos atrás que os efeitos da fototerapia sobre os tecidos biológicos podem ser classificados como primários (interações luz-tecido) ou secundários (fotobiomodulação). Um dos efeitos mais frequentemente observados de fotobiomodulação é o aumento da síntese de ATP em cultura de células (PASSARELLA *et al.*, 1984; KARU; PYATIBRAT e KALENDU, 1995; KARU, 1999).

O aumento da atividade da Cox, resultando em mais síntese de ATP, tem sido a principal explicação dos estudos que utilizaram a fototerapia antes dos exercícios (pré-condicionamento muscular) para aumentar o desempenho, ou após diferentes tipos de exercícios (recuperação muscular) (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Análises de produtos metabólicos como lactato, acúmulo de adenosina difosfato (ADP) e a própria síntese de ATP são importantes para se identificar o melhor desempenho muscular, uma vez que níveis reduzidos de ATP nos músculos têm sido associados à baixa resistência à fadiga e diminuição do desempenho em muitos tipos de exercícios (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008).

A literatura científica nos traz diversas estratégias e terapias para o aumento de desempenho muscular em diferentes esportes. No entanto, muitos medicamentos foram proibidos de serem utilizados para esse fim, pois são considerados “doping” (HOFFMAN *et al.*, 2009). Nesse contexto, na última década, alguns pesquisadores têm usado a fototerapia para promover um pré-condicionamento muscular e aumentar o desempenho em exercícios intensos (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Essas pesquisas

encontraram bons efeitos da fototerapia aplicada em regime de pré-condicionamento muscular, prevenindo o dano muscular e aumentando o número de repetições em testes de fadiga. No entanto, a maioria desses resultados foi modesta quando comparados aos grupos controle, principalmente referente ao número de repetições em testes de fadiga (LEAL JUNIOR *et al.*, 2008; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009d; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b). Pode haver uma falta de entendimento sobre o tempo-resposta dos músculos para a fototerapia, e uma incerteza sobre o melhor momento para se aplicar a luz e induzir uma resistência muscular à fadiga em exercício até a exaustão.

Esse presente estudo teve como objetivo investigar: (a) se a LEDT pode aumentar a síntese de ATP *in vivo*; (b) o possível tempo-resposta para a síntese de ATP nos músculos gastrocnêmio e sóleo em camundongos mediado pela LEDT; (c) o possível tempo-resposta para um aumento de desempenho muscular em teste de fadiga após a LEDT; (d) correlações entre os conteúdos de ATP nos músculos sóleo e gastrocnêmio com o teste de fadiga. Esse estudo sugere que a LEDT pode ser uma nova estratégia para aumentar o desempenho muscular, bem como indica qual é o melhor momento para se usar a LEDT em regime de pré-condicionamento muscular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Esse estudo foi realizado com camundongos machos Balb/c de 8 semanas, pesando em média $20,38 \pm 1,10$ g, alocados em grupos de 5 animais por caixa e mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas. Todos os 50 animais foram fornecidos por *Charles River Laboratories, Wilmington, MA* e foram tratados com água e alimentação *ad libitum* no biotério do *Massachusetts General Hospital*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética (*Institutional Animal Care and*

Use Committee – IACUC) do Massachusetts General Hospital (protocolo #2014N000055) e seguiu as diretrizes dos institutos de saúde americanos (NIH).

Grupos experimentais

Cinquenta animais foram randomicamente alocados em 2 grupos iguais: LEDT-ATP e LEDT-Fadiga. Os conteúdos de ATP nos músculos gastrocnêmio e sóleo foram analisados nos animais alocados no grupo LEDT-ATP. A resistência à fadiga muscular foi analisada nos animais alocados no grupo LEDT-Fadiga. Cada um desses grupos foi subdividido em 5 subgrupos iguais (n=5) com distribuição aleatória dos camundongos [Figura 1]:

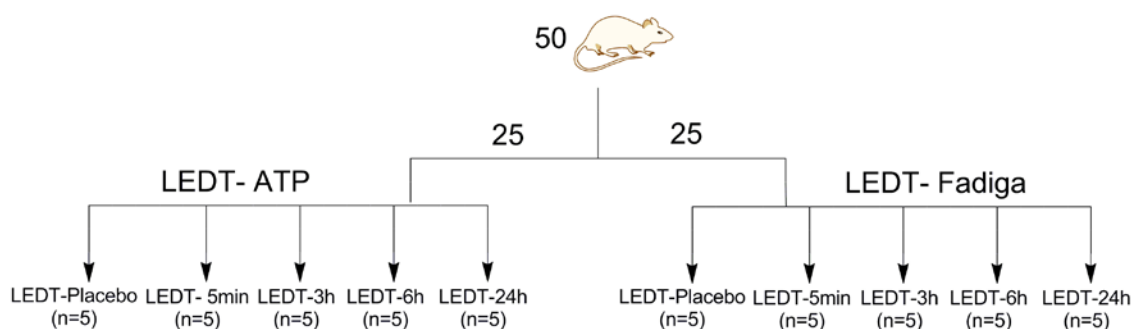


Figura 1 – Randomização e grupos. Cinquenta camundongos machos Balb/c foram primeiramente alocados em 2 grupos iguais: LEDT-ATP e LEDT-Fadiga. Em seguida, ambos os grupos foram subdivididos em 5 grupos iguais: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. Siglas: terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*); ATP = adenosina trifosfato.

1- LEDT-ATP subgrupos:

- LEDT-Placebo: animais tratados com LEDT placebo (equipamento no modo placebo) sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas imediatamente antes (5 minutos) dos procedimentos de cirurgia e sacrifício;

- LEDT-5min: animais tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas 5 minutos antes dos procedimentos de cirurgia e sacrifício;
- LEDT-3h: animais tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas 3 horas antes dos procedimentos de cirurgia e sacrifício;
- LEDT-6h: animais tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas 6 horas antes dos procedimentos de cirurgia e sacrifício;
- LEDT-24h: animais tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas 24 horas antes dos procedimentos de cirurgia e sacrifício.

2- LEDT-Fatdiga subgrupos:

- LEDT-Placebo: animais tratados com LEDT placebo (equipamento no modo placebo) sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas imediatamente antes (5 minutos) do teste de fadiga em escada inclinada;
- LEDT-5min: animais tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas 5 minutos antes do teste de fadiga em escada inclinada;
- LEDT-3h: animais tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas 3 horas antes do teste de fadiga em escada inclinada;

- LEDT-6h: animais tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas 6 horas antes do teste de fadiga em escada inclinada;
- LEDT-24h: animais tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas 24 horas antes do teste de fadiga em escada inclinada.

Procedimentos

Familiarização com a escalada em escada

Foi utilizada uma escada inclinada (80°) com 100 x 9 cm (comprimento e largura, respectivamente) e barras espaçadas com intervalos de 0,5 centímetros, como relatado em um estudo anterior (LEE *et al.*, 2004). No entanto, a máxima distância disponível para a escalada dos animais foi estabelecida em 70 cm a fim de evitar possíveis contatos entre a carga fixada à cauda dos animais e o chão (FERRARESI *et al.*, 2014) [Figura 2]. O procedimento de familiarização consistiu de 4 séries de 10 repetições (escaladas) com períodos de descanso de 2 minutos entre cada série. Nenhuma carga foi fixada à cauda dos camundongos durante esse procedimento como descrito em estudo prévio (FERRARESI *et al.*, 2014). Os animais alocados nos subgrupos do grupo LEDT-Fadiga foram familiarizados a escalarem a escada 2 dias antes de iniciarem o teste de fadiga.



Figura 2 – Escada. Escada inclinada (80°) com 100 x 9 cm (comprimento e largura, respectivamente) usada para o teste de fadiga. Tubo Falcon preenchido com água e fixado à cauda do camundongo.

Terapia LED (Light-emitting diode therapy – LEDT)

Foi utilizado um arranjo não comercial de 40 LEDs (20 vermelhos – 630 ± 10 nm; 20 infravermelhos – 850 ± 20 nm). Os parâmetros da LEDT apresentados na tabela 1 são os mesmos usados em estudo prévio (FERRARESI *et al.*, 2014). A potência óptica do arranjo de LEDs foi mensurada com um medidor de energia e potência óptica PM100D Thorlabs[®] equipado com sensor S142C (area de $1,13 \text{ cm}^2$) a uma distância de 45 mm, como descrito anteriormente (FERRARESI *et al.*, 2014). Os animais foram tricotomizados e fixados sobre uma placa de plástico usando fita adesiva e sem anestesia. Em seguida, de acordo com cada grupo experimental, todos os animais foram tratados com LEDT sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas a uma distância de 45 mm (sem contato) (FERRARESI *et al.*, 2014) [Figura 3]. O tempo de irradiação foi de 90 segundos com os parâmetros descritos na tabela 1. A LEDT

placebo não emitiu luz (0 J) e potência (0 mW) sobre os músculos dos camundongos desses subgrupos. A temperatura sobre a superfície da pele dos camundongos foi monitorada antes e 5 minutos após a irradiação com LEDT usando termômetro. Não houve mudanças na temperatura.

Tabela 1. Parâmetros ópticos da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*). O grupo LEDT-Placebo recebeu a LEDT placebo (equipamento desligado) com o mesmo tempo de tratamento (90 seg).

Número de LEDs (arranjo): 40 (20 infravermelho-IR e 20 vermelho-RED)

Comprimento de onda: 850 nm (IR) and 630 nm (RED)

Frequência de pulso: contínuo

Potência óptica de cada LED: 50 mW (IR) e 25 mW (RED)

Potência óptica (arranjo): 1.000 mW (IR) e 500 mW (RED)

Tamanho do arranjo de LEDs: 45 cm²

Densidade de potência (na superfície epitelial): 80 mW/cm²

Tempo de tratamento: 90 seg

Densidade de energia aplicada (na superfície epitelial): 7,2 J/cm²

Modo de aplicação: sem contato

Distância aos animais ou ao medidor de potência óptica: 45 mm

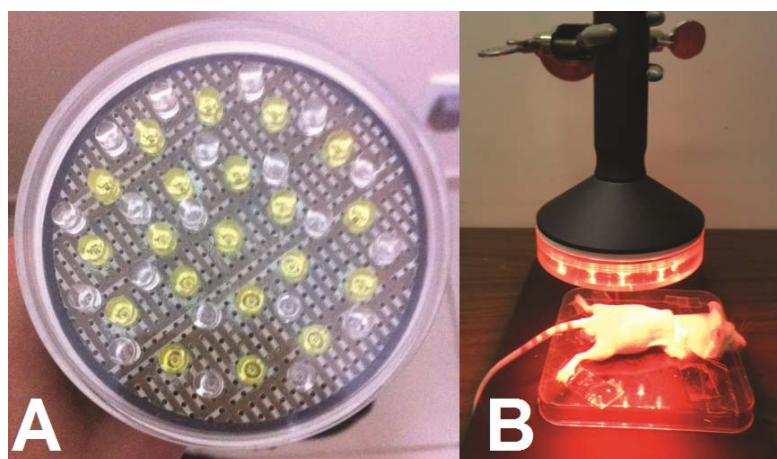


Figura 3 – LEDT. **A)** Distribuição interna do arranjo de LEDs (*light-emitting diodes*). LEDs brancos emitem luz vermelha (630 ± 10 nm) e LEDs amarelos emitem luz infravermelha (850 ± 20 nm). **B)** Posicionamento dos camundongos para receberem a terapia LED (LEDT) sem contato sobre ambas as pernas, glúteos e musculatura inferior das costas.

Anestesia, cirurgia e sacrifício

Todos os camundongos do grupo LEDT-ATP foram submetidos aos procedimentos de anestesia, cirurgia e sacrifício em tempos específicos após irradiação por LEDT em cada subgrupo. Após completarem o teste de fadiga, os animais dos subgrupos do grupo LEDT-Fadiga foram submetidos à anestesia e sacrificados imediatamente.

Anestesia. Os animais foram anestesiados usando Ketamina e Xilazina na proporção de 80 mg/ kg de Ketamina e 12 mg/ kg de Xilazina.

Cirurgia. Após o procedimento de anestesia, os músculos gastrocnêmio e sóleo foram retirados bilateralmente, separados cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, esses músculos foram armazenados a -80° C até as análises de ATP realizadas exatamente 7 dias após a cirurgia.

Sacrifício. Os animais foram sacrificados sob anestesia por meio de deslocamento cervical.

É importante destacar a ordem dos procedimentos conduzidos nesse estudo. O primeiro procedimento foi irradiar todos os animais dos subgrupos do LEDT-ATP (exceto LEDT-Placebo) com LEDT. Durante 7 dias entre o sacrifício desses animais e análises de ATP, o teste de fadiga foi realizado nos subgrupos do LEDT-Fadiga.

Conteúdo de ATP muscular

Os músculos gastrocnêmio e sóleo de uma perna de cada animal foram utilizados nessa análise. As amostras musculares foram descongeladas em gelo por 5 minutos, homogeneizadas na proporção de 3-4 mg de tecido a 500 µl de ácido perclórico (HClO₄) a 10% seguindo procedimentos publicados previamente (KHAN,

2003; FERRARESI *et al.*, 2014). Em seguida, uma alíquota de 10 µl do homogeneizado de músculo adicionado de 40 µl de *CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay mix* (Promega), totalizando 50 µl, foram pipetados em microplaca de 96 poços (Costar™ 96-Well White Clear-Bottom Plates). Os sinais de luminescência foram mensurados em *SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Reader* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com tempo de integração de 5 segundos para aumentar baixos sinais (KHAN, 2003). Foi preparada também uma curva padrão usando *ATP standard* (Sigma) de acordo com o manual de instruções do fabricante e em seguida foi calculada a concentração de ATP em nanomol (nmol) por miligrama de proteína (mg). Uma alíquota do homogeneizado muscular foi usada para quantificar o total de proteína usando *QuantiPro™ BCA Assay kit* (Sigma-Aldrich) de acordo com o manual de instruções do fabricante.

Teste de fadiga

Esse teste foi realizado 48 horas após o procedimento de familiarização e utilizou uma carga correspondente a 150% da massa corporal dos camundongos. Todos os animais alocados no grupo LEDT-Fadiga foram pesados em balança de precisão e então foi calculada a carga alvo. Um tubo Falcon (50 ml) foi preenchido com específicos mililitros de água até alcançar a carga alvo em gramas (FERRARESI *et al.*, 2014). Em seguida, esse tubo foi fixado à cauda do camundongo usando fita adesiva [Figura 2]. Os camundongos realizaram esse teste exatamente 5 minutos, ou 3 horas, ou 6 horas, ou 24 horas após o procedimento de irradiação por LEDT, de acordo com os subgrupos do grupo LEDT-Fadiga. Foram aplicadas pressões leves na cauda dos animais utilizando uma pinça, caso os camundongos parassem de subir a escada. O teste foi interrompido quando os camundongos não foram mais capazes de escalar ou perderam sua força de preensão e escorregaram sobre as grades da escada devido à falha

muscular concêntrica. O número de repetições (escaladas) de cada camundongo foi quantificado durante esse teste. A temperatura da sala onde se realizou o teste de fadiga foi monitorada e mantida entre 22-25 °C.

Coefficiente de correlação ou produto-momento de Pearson

Foram calculadas correlações entre os conteúdos de ATP no músculo sóleo e o número de repetições (escaladas) no teste de fadiga, bem como os conteúdos de ATP no gastrocnêmio e o teste de fadiga. Todas as correlações foram calculadas a fim de confirmar uma positiva relação entre o conteúdo de ATP muscular e o desempenho muscular, como reportado anteriormente (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). Os valores do índice r foram interpretados como recomendado previamente (WEBER e LAMB, 1970): 0,00–0,19 = nenhuma a leve; 0,20–0,39 = baixa; 0,40–0,69 = moderada; 0,70–0,89 = alta; e 0,90–1,00 = muito alta.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk's W verificou a normalidade da distribuição dos dados. Os conteúdos de ATP nos músculos sóleo e gastrocnêmio entre todos os grupos foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD. Foi conduzida uma análise de correlação entre o teste de fadiga e o conteúdo de ATP nos músculos sóleo e gastrocnêmio usando o coeficiente de correlação ou o produto-momento de Pearson. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Conteúdo de ATP no músculo sóleo

O subgrupo LEDT-6h ($85,80 \pm 16,41$ nmol/ mg proteína) teve o maior conteúdo de ATP no sóleo comparado aos subgrupos LEDT-Placebo ($27,48 \pm 2,28$ nmol/ mg proteína; $P < 0,001$), LEDT-5min ($36,62 \pm 12,36$ nmol/ mg proteína; $P < 0,001$), LEDT-3h ($57,92 \pm 7,40$ nmol/ mg proteína; $P = 0,011$) e LEDT-24h ($45,54 \pm 13,84$ nmol/ mg proteína; $P < 0,001$). Além desses resultados, o subgrupo LEDT-3h teve maior conteúdo de ATP no músculo sóleo comparado ao subgrupo LEDT-Placebo ($P = 0,005$), mas sem significância estatística comparado aos subgrupos LEDT-5min ($P = 0,070$) e LEDT-24h ($P = 0,491$). O subgrupo LEDT-24h não teve diferença no conteúdo de ATP comparado aos subgrupos LEDT-Placebo ($P = 0,158$) e LEDT-5min ($P = 0,761$). Finalmente, LEDT-5min não teve diferença no conteúdo de ATP comparado ao LEDT-Placebo ($P = 0,745$) [Figura 4A].

Conteúdo de ATP no músculo gastrocnêmio

O subgrupo LEDT-6h ($142,30 \pm 11,13$ nmol/ mg proteína) teve também o maior conteúdo de ATP no músculo gastrocnêmio comparado aos subgrupos LEDT-Placebo ($18,71 \pm 4,27$ nmol/ mg proteína; $P < 0,001$), LEDT-5min ($23,30 \pm 3,14$ nmol/ mg proteína; $P < 0,001$), LEDT-3h ($87,67 \pm 15,66$ nmol/ mg proteína; $P < 0,001$) e LEDT-24h ($39,72 \pm 10,76$ nmol/ mg proteína; $P < 0,001$). Além desses resultados, o subgrupo LEDT-3h teve o segundo maior conteúdo de ATP no músculo gastrocnêmio comparado aos subgrupos LEDT-Placebo ($P < 0,001$), LEDT-5min ($P < 0,001$) e LEDT-24h ($P < 0,001$). O subgrupo LEDT-24h teve mais conteúdo de ATP comparado ao subgrupo LEDT-Placebo ($P = 0,028$), mas sem significância estatística comparado ao LEDT-

5min ($P = 0,117$). Finalmente, o subgrupo LEDT-5min não foi diferente do LEDT-Placebo ($P = 0,950$) [Figura 4B].

Teste de fadiga

O subgrupo LEDT-6h ($67,40 \pm 3,05$ repetições) realizou significativamente mais repetições comparado aos subgrupos LEDT-Placebo ($11,86 \pm 0,89$ repetições; $P < 0,001$), LEDT-5min ($13,90 \pm 0,82$ repetições; $P < 0,001$), LEDT-3h ($31,04 \pm 3,42$ repetições; $P < 0,001$) e LEDT-24h ($23,60 \pm 3,02$ repetições; $P < 0,001$). Além desses resultados, o subgrupo LEDT-3h realizou mais repetições comparado aos subgrupos LEDT-Placebo ($P < 0,001$), LEDT-5min ($P < 0,001$) e LEDT-24h ($P = 0,001$). O subgrupo LEDT-24h realizou mais repetições comparado aos subgrupos LEDT-Placebo ($P < 0,001$) e LEDT-5min ($P < 0,001$). Finalmente, o subgrupo LEDT-5min não apresentou diferença estatística comparado ao subgrupo LEDT-Placebo ($P = 0,700$) [Figura 4C].

Coefficiente de correlação ou produto-momento de Pearson

Os conteúdos de ATP no sóleo tiveram uma alta correlação ($r = 0,84$) com o número de repetições realizadas no teste de fadiga ($P < 0,001$). Os conteúdos de ATP no músculo gastrocnêmio apresentaram uma correlação muito alta ($r = 0,94$) com o teste de fadiga ($P < 0,001$) [Figura 4D e 4E].

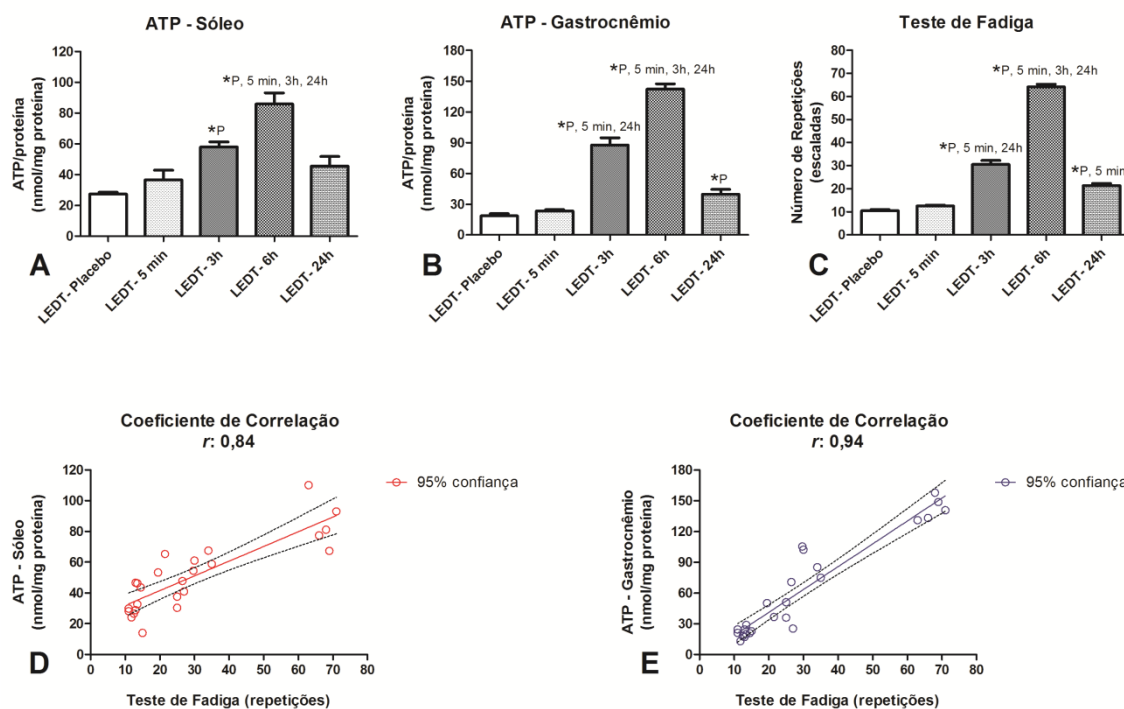


Figura 4 – ATP, teste de fadiga e correlações (n= 5 animais por subgrupo). A) Conteúdos de ATP no músculo sóleo para os subgrupos do grupo LEDT-ATP: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. **B)** Conteúdos de ATP no músculo gastrocnêmio para os subgrupos do grupo LEDT-ATP: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. **C)** Teste de fadiga para os subgrupos do grupo LEDT-Fadiga: LEDT-Placebo; LEDT-5min; LEDT-3h; LEDT-6h e LEDT-24h. **D)** Coeficiente de correlação de Pearson (índice r) entre o conteúdo ATP no músculo sóleo e o teste de fadiga. **E)** Coeficiente de correlação de Pearson (índice r) entre o conteúdo ATP no músculo gastrocnêmio e o teste de fadiga. Siglas: LEDT = Terapia LED (*light-emitting diode therapy*); ATP = adenosina trifosfato; P= LEDT-Placebo; 5 min= LEDT-5min; 3h= LEDT-3h; 24h= LEDT-24h; *= significância estatística ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

O nosso estudo encontrou expressivos efeitos positivos da LEDT no aumento da síntese de ATP *in vivo*, bem como estabeleceu um tempo-resposta para esse fenômeno de fotobiomodulação. Nós também encontramos resultados similares para a LEDT aumentar a resistência à fadiga muscular em teste de fadiga realizado em escada inclinada. Além desses resultados, o conteúdo de ATP e a resistência à fadiga muscular

foram altamente correlacionados, confirmando uma relação positiva como relatada anteriormente (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). No entanto, é importante destacar que os valores do índice r desse estudo não podem inferir o quanto o ATP muscular é responsável pelo desempenho muscular. Para essa proposta, é necessário calcular os valores de r^2 , mas esse estudo não foi desenhado para tal objetivo. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo demonstrando o tempo-resposta para os efeitos da fototerapia sobre a síntese de ATP muscular e resistência muscular à fadiga *in vivo*.

Desde que a citocromo c oxidase (Cox) foi reportada como o principal cromóforo celular (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010), mudanças no metabolismo mitocondrial, estresse oxidativo e aumento na síntese de ATP têm sido considerados importantes mecanismos na fototerapia de baixa intensidade (KARU, 1999). Dessa maneira, esse estudo usou a fototerapia para modular a síntese de ATP como já realizado previamente *in vitro* (PASSARELLA *et al.*, 1984; KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995; KARU, 1999), mas explorou o melhor momento para aplicar essa terapia antes do exercício.

Estudos prévios usaram a fototerapia para realizarem o pré-condicionamento muscular, irradiando os músculos alvo 5 minutos antes de testes de fadiga *in vivo* (LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; DE ALMEIDA *et al.*, 2011) ou em estudo clínicos (LEAL JUNIOR *et al.*, 2008; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009d; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b). Esses estudos relataram um aumento do número de repetições e conseqüentemente uma melhor resistência à fadiga muscular. Os nossos resultados de resistência muscular à fadiga em escada inclinada para os subgrupos LEDT-3h, LEDT-6h e LEDT-24h confirmam esses resultados prévios, exceto o subgrupo LEDT-5min. O

número de repetições no teste de fadiga foi aumentado de maneira expressiva nos subgrupos LEDT-6h (cerca de 600%), LEDT-3h (cerca de 300%) e LEDT-24h (cerca de 200%) comparado aos subgrupos LEDT-Placebo e LEDT-5min, estabelecendo, assim, um tempo-resposta bem definido para a LEDT aumentar a resistência à fadiga muscular. Apesar do subgrupo LEDT-5min aumentar levemente o número de repetições (escaladas) no teste de fadiga (cerca de 20%) comparado ao subgrupo LEDT-Placebo, esse aumento foi realmente pequeno e por esta razão não teve significância estatística. Seria necessário um estudo com maior número de animais para fornecer um poder estatístico necessário para provar, de fato, essa diferença. Possivelmente o uso de um teste-t entre os subgrupos LEDT-Placebo e LEDT-5min poderia evidenciar uma diferença estatística, como já foi reportado em estudos prévios envolvendo o uso de laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy – LLLT*) e pré-condicionamento muscular (LEAL JUNIOR *et al.*, 2008; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009d; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b).

HAYWORTH *et al.* (2010) relatou modulações na atividade da Cox 24h após o uso da fototerapia por LEDs (LEDT) sobre os músculos temporais de ratos, mas essas modulações foram dependentes do tipo de metabolismo das fibras musculares que, por sua vez, sugerem diferenças na síntese de energia (ATP). Por essa razão, o nosso estudo avaliou o efeito da LEDT sobre a síntese de ATP nos músculos com predomínio de metabolismo aeróbio (sóleo) e misto (aeróbio e anaeróbio – gastrocnêmio) (SCHUENKE *et al.*, 2008). Os nossos resultados mostraram claramente um aumento na síntese de ATP em ambos os tipos de músculos após a LEDT, mostrando um tempo-resposta bem definido. Estudos prévios já relataram um aumento na síntese de ATP em cultura de células após a fototerapia (PASSARELLA *et al.*, 1984; KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995; KARU, 1999). Já o nosso estudo mostra que o

aumento na síntese de ATP ocorre no tecido muscular durante um amplo intervalo de tempo (principalmente de 3 horas até 24 horas), evidenciando que as reações secundárias (KARU, 1999) ocorrem ao longo do tempo *in vivo*.

O aumento do conteúdo de ATP muscular sugere que mais energia está disponível para todos os processos metabólicos, incluindo a contração muscular (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). Corroborando essa afirmação, os nossos resultados para o conteúdo de ATP muscular e resistência muscular à fadiga foram altamente correlacionados, reforçando a importância de um bom fornecimento de energia para se alcançar o melhor desempenho muscular nos exercícios (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). Nesse contexto de metabolismo energético, o nosso grupo de pesquisa já relatou os possíveis efeitos da fototerapia sobre a resíntese de fosfocreatina (Cr-P) por meio do ATP produzido nas mitocôndrias, assim como o consumo de lactato produzido pelo metabolismo anaeróbio durante exercícios de força ou resistência à fadiga (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012). Dessa maneira, acreditamos que esses mecanismos possivelmente melhoraram o fornecimento de energia durante o teste de fadiga.

Olhando mais profundamente para os nossos resultados, nós observamos que apesar do aumento do conteúdo de ATP no músculo sóleo mostrar como o metabolismo mitocondrial foi estimulado pela fototerapia, o músculo gastrocnêmio revelou uma melhor correlação (coeficiente de Pearson, $r = 0,94$) com o teste de fadiga. O músculo gastrocnêmio tem um metabolismo misto (oxidativo e glicolítico) (SCHUENKE *et al.*, 2008) e talvez a fototerapia possa modular essas duas diferentes vias metabólicas. Em resumo, os nossos resultados sugerem que os metabolismos glicolítico e oxidativo são estimulados pela fototerapia, considerando que a mitocôndria necessita de acetil

coenzima A (acetil-Coa) vindo da glicólise e/ ou da beta-oxidação para realizar a síntese de ATP.

A densidade de potência (irradiância) e dose de luz (fluência) da fototerapia usada nesse estudo foi baseada na possível dose-resposta bifásica relatada anteriormente (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011). No entanto, nós usamos luz vermelha e infravermelha (dois comprimentos de onda) para irradiarem o tecido muscular ao mesmo tempo, baseando-se em específicas bandas de absorção dos cromóforos celulares para absorverem essas luzes (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010). É possível que aproveitando as duplas bandas de absorção (vermelho e infravermelho próximos em conjunto) poderia otimizar os efeitos da fotobiomodulação no aumento da síntese de ATP e resistência à fadiga muscular. Além disso, a fototerapia foi aplicada sem contato, como relatado por estudo prévio (HAYWORTH *et al.*, 2010; FERRARESI *et al.*, 2014), cobrindo todos os músculos alvo (gastrocnêmio, sóleo, glúteo, e musculatura inferior das costas), além de permitir estimular os músculos por inteiro simultaneamente, como reportado anteriormente (FERRARESI *et al.*, 2011). Finalmente, como a fototerapia foi aplicada sem contato, possivelmente ocorreu reflexão da luz sobre a superfície dos animais (principalmente sobre as áreas curvas). Esse fenômeno poderia produzir perda de penetração dos fótons pela pele e que alcançariam os músculos. No entanto, a interação luz-tecido é fortemente dependente da potência óptica da luz (Lei de Beer-Lambert) e dos cromóforos que absorvem essa luz (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010). Por essas razões, foi realizada a irradiação com um grande arranjo de LEDs sem contato, ao invés de irradiar ponto a

ponto usando um feixe de luz pequeno, a fim de cobrir toda a área muscular de todos os músculos ao mesmo tempo.

CONCLUSÃO

Esse é o primeiro estudo relatando um tempo-resposta bem definido para o aumento da síntese de ATP muscular e resistência muscular à fadiga por meio da fototerapia usando dois comprimentos de onda (vermelho e infravermelho próximo) aplicados sobre músculos esqueléticos.

Os resultados apresentados nesse estudo podem ser usados em estudos futuros que tenham como objetivo determinar se um tempo-resposta semelhante ocorre nos músculos em humanos após uma dose de luz de LEDT ajustada para humanos. Pode ser possível usar a fototerapia para melhorar o desempenho muscular nos esportes de alto rendimento, bem como em uma miríade de diferentes aplicações nas áreas da ciência médica ou saúde.

Terapia LED (*light-emitting diode therapy - LEDT*) associada ao treinamento em camundongos aumenta o desempenho muscular, atividade da citocromo c oxidase, ATP, glicogênio, proliferação celular e defesas antioxidantes

Artigo publicado no periódico *Journal of Biophotonics* – (ANEXO IV)

FERRARESI, C.; PARIZOTTO, N. A.; PIRES DE SOUSA, M. V.; KAIPPERT, B.; HUANG, Y.-Y.; KOISO, T.; BAGNATO, V. S.; HAMBLIN, M. R. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. **Journal of Biophotonics** [S.I.], v. 9999, n. 9999, p. n/a-n/a, 2014.

RESUMO

A terapia LED (*light-emitting diode therapy* - LEDT) aplicada sobre os músculos dos membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas de camundongos usando um arranjo de LEDs (630 nm and 850 nm; 80mW/cm²; 7,2J/cm²) aumentou o desempenho muscular, o conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) e metabolismo mitocondrial, marcadores do estresse oxidativo e proliferação de miócitos em camundongos submetidos a treinamento de força agudo e progressivo. Após seis sessões de treinamentos em dias não consecutivos (a cada 48 horas), os grupos LEDT- Após e LEDT-Antes- Após mais que duplicaram o desempenho muscular e aumentaram mais que dez vezes o conteúdo de ATP muscular. A efetividade da LEDT no aumento de desempenho e recuperação muscular sugere aplicabilidade para esportes de alto rendimento e programas de treinamento.

Palavras-chave: desempenho muscular, LEDT, laser de baixa intensidade, recuperação muscular, ATP

INTRODUÇÃO

A fototerapia de baixa intensidade usando lasers (*low-level laser therapy – LLLT*) e LEDs (*light-emitting diode therapy – LEDT*) tem várias aplicações na medicina como no tratamento da dor (ENWEMEKA *et al.*, 2004; CHOW *et al.*, 2009), tendinopatias (TUMILTY *et al.*, 2010) e acelerar o reparo tecidual (ENWEMEKA *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2012). Desde 1960 quando os primeiros equipamentos de laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) foram construídos, muitas aplicações dessa terapia e seus mecanismos de ação têm sido investigados em todo o mundo (HUANG *et al.*, 2009).

A fototerapia pode ser realizada por diferentes fontes de luz como diodos de laser e LEDs (*light-emitting diodes*). Essas fontes de luz diferem quanto à monocromaticidade e coerência, uma vez que os diodos de laser são mais coerentes, têm uma estreita banda espectral e menor divergência de seus feixes de luz comparados à luz emitida por LEDs (HUANG *et al.*, 2009). As regiões espectrais geralmente usadas na fototerapia estão na região do vermelho (600 nm) ao infravermelho (1000 nm) com potência total entre 1 mW – 500 mW e densidade de potência (irradiância) entre 1 mW – 5 W/ cm² (HUANG *et al.*, 2009). Esses lasers e LEDs podem produzir efeitos equivalentes sobre o tecido se a dose de luz entregue/ aplicada estiver de acordo com a possível dose-resposta bifásica previamente reportada na literatura (ENWEMEKA, 2005; HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011). E a interação luz-tecido depende da absorção da luz por estruturas específicas dentro das células que são conhecidas como cromóforos (KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010).

Recentemente a fototerapia por lasers e LEDs tem sido utilizada para aumentar o desempenho muscular nos exercícios envolvendo força (FERRARESI *et al.*, 2011) ou

resistência à fadiga (BARONI *et al.*, 2010b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; VIEIRA *et al.*, 2012) e, por isso, a fototerapia pode ter um papel importante na preparação de atletas em competições nos esportes de alto rendimento. Recentes estudos de revisão reportaram efeitos positivos da fototerapia sobre o desempenho muscular, destacando um efeito protetor contra o dano muscular induzido pelo exercício (BORSA; LARKIN e TRUE, 2013); um aumento no número de repetições em testes de esforço máximo (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013); aumento na carga de trabalho, torque e resistência muscular à fadiga em programas de treinamento; bem como uma visão global sobre os principais e possíveis mecanismos de ação da fototerapia sobre o tecido muscular (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012).

Vários fatores biológicos regulam o sucesso ou o desempenho ideal nos esportes que envolvem exercícios de alta intensidade, ou alternativamente exercícios que envolvem resistência, sendo que ambos exigem uma adaptação muscular durante os programas de treinamentos pré-competição. Entre esses fatores estão a depleção do suprimento energético para a contração muscular que compreendem adenosina trifosfato (ATP) e glicogênio; possível acúmulo de metabólitos deletérios oriundos do metabolismo energético como lactato, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), íons Ca^{2+} e H^{+} ; produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BANERJEE *et al.*, 2003; FINAUD; LAC e FILAIRE, 2006; ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008; POWERS e JACKSON, 2008); e o processo de recuperação das microlesões ou danos musculares (FOLLAND e WILLIAMS, 2007). A fototerapia parece ser capaz de beneficiar todas essas “limitações” uma vez que seus mecanismos de ação envolvem a melhora do metabolismo mitocondrial e aumento na síntese de ATP (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995; KARU, 1999) devido a uma atividade aumentada da enzima citocromo c oxidase (COX) na cadeia transportadora de elétrons

(CTE) (KARU, 1999; KARU *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2009); redução de EROS ou aumento das defesas antioxidantes (SILVEIRA *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2013); e pode estimular mais rapidamente o reparo muscular devido a um aumento na proliferação e diferenciação de células musculares (NAKANO *et al.*, 2009).

Estudos experimentais e clínicos com diferentes metodologias reportaram os benefícios da fototerapia sobre o desempenho muscular quando aplicada antes (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; SANTOS *et al.*, 2014) ou após os exercícios (FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012; CORAZZA *et al.*, 2013). No entanto não há um consenso sobre o melhor momento para a aplicação da fototerapia (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012), assim como o melhor comprimento de onda (vermelho ou infravermelho) para estimular as células musculares e aumentar o desempenho muscular ainda não está muito claro.

No presente estudo foi utilizado um modelo experimental que submeteu camundongos a realizarem exercícios em escada de forma semelhante ao reportado em estudo prévio (LEE *et al.*, 2004), a fim de simular um treinamento clínico de força que nos permitisse identificar qual o melhor momento de aplicação da fototerapia para aumentar o desempenho muscular. Quatro diferentes regimes de fototerapia foram aplicados sobre os membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas de camundongos durante um programa de treinamento: placebo; antes; antes-após; e após cada sessão de treinamento. A fototerapia aplicada utilizou a terapia por LEDs (LEDT) irradiando dois comprimentos de onda simultaneamente (vermelho e infravermelho). Foram realizadas avaliações de desempenho muscular (carga, número de repetições, trabalho e potência muscular), marcadores de energia celular e metabolismo (ATP, glicogênio e COX); marcadores de estresse oxidativo (proteínas carboniladas, glutathiona, atividade da catalase, peroxidação lipídica, proteína tiol) e proliferação de

células musculares (BrdU – 5-bromo-2'-deoxiuridina) e mionúcleos adultos (DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Esse estudo foi realizado com camundongos machos Balb/c de 8 semanas, pesando em média 22,22 g (Erro padrão da média – EP 0,24), alocados em grupos de cinco animais por caixa e mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas cada. Os 22 animais foram fornecidos por *Charles River Inc* e tiveram água e alimentação *ad libitum* no biotério do *Massachusetts General Hospital*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética (*Institutional Animal Care and Use Committee – IACUC*) do *Massachusetts General Hospital* (protocolo #2014N000055) e seguiu as diretrizes dos institutos de saúde americanos (NIH).

Grupos experimentais

Vinte dois animais foram alocados randomicamente em 4 grupos de 5 animais cada, e 2 animais foram alocados no grupo controle absoluto:

- Grupo LEDT-Placebo: os animais foram tratados com LEDT placebo (equipamento no modo placebo) sobre ambos os membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas 5 minutos antes de cada sessão de treinamento em escada.
- Grupo LEDT-Antes: os animais foram tratados com LEDT real sobre ambos os membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas 5 minutos antes de cada sessão de treinamento em escada.

- LEDT-Antes-Depós: os animais foram tratados com LEDT real sobre ambos os membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas 5 minutos antes e 5 minutos após cada sessão de treinamento em escada.
- LEDT-Depós: os animais foram tratados com LEDT real sobre ambos os membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas 5 minutos após de cada sessão de treinamento em escada.
- Controle: os animais não foram submetidos a qualquer avaliação de desempenho muscular ou LEDT.

Escada

Foi utilizada neste estudo uma escada inclinada (80°) com dimensões de 100 x 9 cm (comprimento e largura, respectivamente) e barras espaçadas com intervalos de 0,5 centímetros, como relatado em um estudo anterior (LEE *et al.*, 2004) [Figura1].



Figura 1 – Escada. Escada inclinada (80°) com 100 x 9 cm (comprimento e largura, respectivamente) utilizada para o programa de treinamento e avaliações de desempenho muscular. Tubo Falcon preenchido com água e fixado à cauda do camundongo.

Carga

Um tubo Falcon (50 ml) foi preenchido com volumes específicos de água e pesado em balança de precisão. A carga alvo foi alcançada adicionando ou removendo água do tubo e então fixado à cauda do camundongo usando fita adesiva [Figura 1]. Todas as cargas foram calculadas em gramas.

Procedimentos

A programação das sessões de treinamento e testes de desempenho muscular está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Programação dos procedimentos de exercício e teste de desempenho muscular.

Dia	Procedimento	Nº repetições	Carga
Dia 1	Familiarização	4 X 10 = 40	zero
Dia 2	3RM – pré	3	A partir de 2 X MC
Dia 3	Treinamento 1	5 X 10 = 50	0,8 X 3RM
Dia 5	Treinamento 2	5 X 10 = 50	0,9 X 3RM
Dia 7	Treinamento 3	5 X 10 = 50	1,0 X 3RM
Dia 9	Treinamento 4	5 X 10 = 50	1,1 X 3RM
Dia 11	Treinamento 5	5 X 10 = 50	1,2 X 3RM
Dia 13	Treinamento 6	5 X 10 = 50	1,3 X 3RM
Dia 14	3RM - final	3	A partir de 3 X MC

Siglas: MC= massa corporal; 3RM= carga média carregada por cada animal durante o teste de três repetições máximas.

Familiarização com a escalada em escada

Todos os grupos do estudo, exceto o grupo controle, foram familiarizados com a escalada em escada inclinada um dia antes do início da avaliação do desempenho muscular e treinamento. O procedimento de familiarização consistiu de 4 séries de 10 repetições (escaladas) na escada com períodos de descanso de 2 minutos entre cada série. Nenhuma carga foi fixada à cauda dos camundongos durante esse procedimento.

Carga de três repetições máximas (3RM)

Esta foi a primeira avaliação de desempenho muscular e foi definida como a média da carga máxima que cada animal carregou durante 3 escaladas completas e consecutivas realizadas em escada inclinada (3RM).

Caso o animal parasse durante a escalada, foi aplicada uma leve pressão na cauda dos camundongos utilizando uma pinça. O teste foi interrompido quando os animais não foram mais capazes de subir a escada ou perderam sua força de preensão sobre as grades da escada devido à falha na contração muscular. A primeira tentativa incluiu uma carga correspondendo a 200% da massa corporal de cada camundongo. Foi realizado um máximo de três tentativas para o teste de 3RM. Se um animal finalizasse a escalada da escada com uma determinada carga, eram adicionados 10% de carga para a próxima tentativa. No entanto, se o animal não conseguisse escalar, a carga era diminuída em 10% para a próxima subida. O teste de 3RM foi realizado duas vezes durante o estudo: a primeira foi 24 horas após o procedimento de familiarização com a escalada em escada (linha de base – pré), e a segunda foi conduzida 24 horas após a última sessão de treinamento (final).

Protocolo agudo de treinamento de força

Após 24h do teste de 3RM na linha de base, todos os grupos experimentais, exceto o grupo controle, foram submetidos a 6 sessões de treinamento em dias alternados (a cada 48h). Cada sessão de treinamento consistiu de 5 séries de 10 repetições (escaladas) sobre a escada inclinada com um período de descanso de 2 minutos entre cada série. Se o animal não completasse a série ou não fosse capaz de completar uma das repetições (escaladas) da série, era mensurada a distância (em centímetros) e imediatamente era iniciado o período de descanso. Durante algumas

repetições foi realizada uma leve pressão sobre a cauda dos animais utilizando uma pinça a fim de estimular o animal a subir a escada e completar o exercício. Se depois de três pressões suaves o camundongo não fosse capaz de continuar a subir, e parasse ou perdesse sua força de preensão sobre as grades da escada, a série de exercício era interrompida e era iniciado o período de descanso.

O número de repetições (escaladas) em cada série foi mensurado assim como o tempo despendido para completar esse exercício. Esses dados foram utilizados para calcular o trabalho e a potência muscular em cada sessão de treinamento. A carga de cada sessão de treinamento foi aumentada progressivamente e calculada como percentuais da carga do teste de 3RM (em gramas) da linha de base: primeira sessão de treinamento (80%), segunda sessão (90%), terceira sessão (100%), quarta sessão (110%), quinta sessão (120%) e sexta sessão (130%).

Terapia LED (Light-emitting diode therapy – LEDT)

Foi utilizado nesse estudo um arranjo não comercial de 40 LEDs (20 vermelhos – 630 ± 10 nm; 20 infravermelhos – 850 ± 20 nm) com um diâmetro de 76 mm. Todos os parâmetros da LEDT estão descritos na tabela 2. A potência óptica da LEDT que irradiou a superfície epitelial do camundongo foi mensurada com um medidor de potência óptica PM100D Thorlabs[®] equipado com um sensor modelo S142C (area de $1,13 \text{ cm}^2$). Todos os animais (exceto os animais do grupo controle) foram submetidos à tricotomia e fixados sobre uma placa de plástico usando fitas adesivas. Após esses procedimentos, e de acordo com os grupos experimentais, esses animais foram tratados com LEDT sobre ambos os membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas a uma distância de 45 mm (sem contato) [Figura 2]. O tempo de irradiação foi de 90 seg. por sessão com os parâmetros fixos reportados na tabela 2. A LEDT placebo não

emitiu energia (0 Joule) e potência (0 mW) sobre os músculos alvo. A dose de luz utilizada nesse estudo foi baseada na possível dose-resposta bifásica relatada anteriormente (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011). Além disso, escolhemos utilizar dois comprimentos de onda para irradiar os animais ao mesmo tempo baseando-se nas especificidades dos cromóforos dentro das células e assim otimizar os efeitos da terapia LED (LEDT) por meio de uma dupla banda de absorção (KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010).

Tabela 2. Parâmetros ópticos da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*). O grupo LEDT-Placebo recebeu a LEDT placebo (equipamento desligado) com o mesmo tempo de tratamento (90 seg).

Número de LEDs (arranjo): 40 (20 infravermelho-IR e 20 vermelho-RED)

Comprimento de onda: 850 nm (IR) and 630 nm (RED)

Frequência de pulso: contínuo

Potência óptica de cada LED: 50 mW (IR) e 25 mW (RED)

Potência óptica (arranjo): 1.000 mW (IR) e 500 mW (RED)

Tamanho do arranjo de LEDs: 45 cm²

Densidade de potência (na superfície epitelial): 80 mW/cm²

Tempo de tratamento: 90 seg

Densidade de energia aplicada (na superfície epitelial): 7,2 J/cm²

Modo de aplicação: sem contato

Distância aos animais ou ao medidor de potência óptica: 45 mm

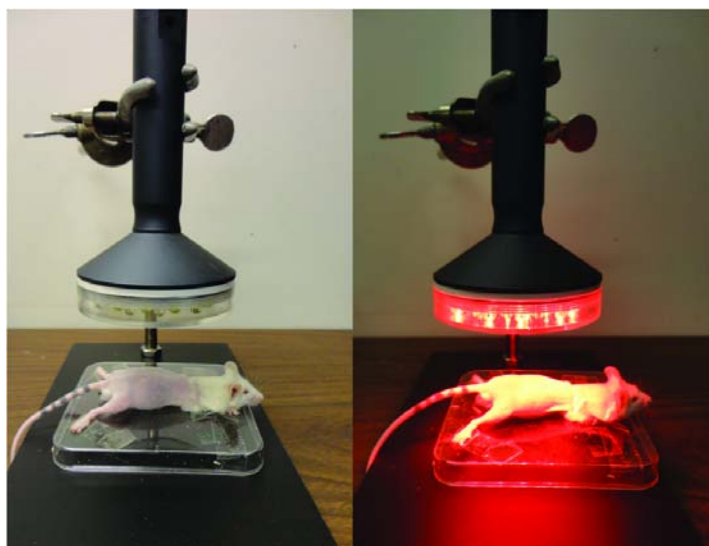


Figura 2 – LEDT. Posicionamento dos animais e aplicação da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*) sobre os membros inferiores, glúteos e musculatura inferior das costas sem contato.

Anestesia, cirurgia e sacrifício

Anestesia. Cinco horas após o teste de 3RM final, todos os animais que foram submetidos ao programa de treinamento e os animais do grupo controle foram anestesiados usando Ketamina e Xilazina na proporção de 80 mg/ kg de Ketamina e 12 mg/ kg de Xilazina.

Cirurgia. Após o procedimento anestésico, foram retirados os músculos gastrocnêmio e quadríceps femoral [Figura 3]. Os músculos gastrocnêmio e sóleo foram retirados de uma das pernas do animal, separados cirurgicamente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Ambos os músculos foram armazenados a -80°C até a análise de ATP no gastrocnêmio realizada exatamente 7 dias após a cirurgia. Ambos os quadríceps femoral foram retirados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80°C até a realização das análises para quantificação de glicogênio e marcadores

de estresse oxidativo. O músculo gastrocnêmio da segunda perna foi retirado, separado cirurgicamente do músculo sóleo e fixado em formalina tamponada a 10% (Fisher Scientific, SF100-20) durante 72 horas para a inclusão em parafina e análises de imunofluorescência.

Sacrifício. Finalmente os animais foram sacrificados por meio de deslocamento cervical ao final do procedimento cirúrgico enquanto os animais ainda estavam sob efeito da anestesia.



Figura 3 – Cirurgia. Após a anestesia, os camundongos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para a retirada dos músculos gastrocnêmio, sóleo e quadríceps femoral. O gastrocnêmio e sóleo foram separados cirurgicamente antes das análises.

Desempenho muscular

O teste de 3RM foi a primeira avaliação de desempenho muscular. Esse teste mensurou a carga máxima (em gramas) que cada animal foi capaz de carregar durante 3 escaladas completas e consecutivas sobre a escada inclinada.

Durante cada sessão de treinamento foram registrados a carga, número de repetições (escaladas), distância escalada e o tempo gasto para completar cada repetição. Esses dados foram utilizados para calcular o trabalho e a potência muscular.

Apesar de a escada ter um comprimento total de 100 cm, a máxima distância disponível para cada escalada foi determinada como 70 cm, a fim de evitar que a carga fixada à cauda dos animais tocasse o chão. Assim, o trabalho muscular foi calculado da seguinte maneira:

$$\text{Trabalho (J)} = mgh$$

Onde “m” é a massa da carga (gramas convertida para kilograma) em cada sessão de treinamento, mais a massa corporal de cada animal (valores convertidos para kilogramas); “g” é a aceleração da gravidade e “h” é a distância escalada (convertida para metros). Os resultados foram obtidos em Joules (J) e apresentados como média \pm erro padrão da média (EP) para cada grupo em cada sessão de treinamento.

A potência muscular foi calculada a partir dos resultados do trabalho muscular (J) e o tempo gasto (seg) para os animais realizarem todas as repetições de cada série em todas as sessões de treinamento, como segue abaixo:

$$\text{Potência (mW)} = J/\text{seg}$$

Onde “J” é Joule e representa o trabalho muscular realizado e “seg” é o tempo em segundos. Os resultados obtidos foram em miliwatts (mW) e apresentados como média \pm erro padrão da média (EP) para cada grupo em cada sessão de treinamento.

ATP muscular

O músculo gastrocnêmio de uma perna de cada animal foi utilizado para as análises de ATP muscular. As amostras desses músculos que estavam congeladas a -80 °C foram descongeladas em gelo durante 5 minutos, homogeneizadas na proporção de 3-4 mg de tecido a 500 µl de ácido perclórico (HClO₄) a 10% seguindo procedimentos publicados previamente (KHAN, 2003). Em seguida, uma alíquota de 10 µl do homogeneizado de músculo adicionado de 40 µl de *CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay mix* (Promega), totalizando 50 µl, foram pipetados em microplaca de 96 poços (CostarTM 96-Well White Clear-Bottom Plates). Os sinais de luminescência foram mensurados em *SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Reader* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com tempo de integração de 5 segundos para aumentar baixos sinais (KHAN, 2003). Foi preparada também uma curva padrão usando *ATP standard* (Sigma) de acordo com o manual de instruções do fabricante e em seguida foi calculada a concentração de ATP em nanomol (nmol) por miligrama de proteína (mg). Uma alíquota do homogeneizado muscular foi usada para quantificar o total de proteína usando *QuantiProTM BCA Assay kit* (Sigma-Aldrich) de acordo com o manual de instruções do fabricante.

Glicogênio muscular

Os músculos do quadríceps femoral foram descongelados por 30 minutos e o glicogênio muscular foi mensurado em 50 mg de tecido homogeneizado com 6N NaOH na proporção de 50 mg/ ml. Um curva padrão foi preparada usando etanol absoluto (100%), K₂SO₄ (10%), phenol (4.1%) and 1 mM de glicose (2%) de acordo DUBOIS *et al.* (1951). A densidade óptica foi mensurada em 480 nm em espectrofotômetro

(Evolution™ 300 UV-Vis, software VISPRO – Thermo Scientific) e os dados foram normalizados por miligrama de tecido muscular.

Marcadores de estresse oxidativo

Proteína carbonilada. Os músculos do quadríceps femoral foram homogeneizados em água deionizada (dH₂O) na proporção de 10 mg/ 200 µl. O conteúdo de proteína carbonilada foi quantificado usando *Protein Carbonyl Content Assay kit* (Biovision) pelo método colorimétrico e seguindo o manual de instruções do fabricante. Todos os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína quantificada por *QuantiPro™ BCA Assay kit* (Sigma-Aldrich) seguindo o manual de instruções do fabricante.

Glutationa. Os músculos do quadríceps femoral foram homogeneizados em 100 mM de tampão fosfato gelado (pH=7,4) na proporção de 10 mg/ 250 µl. O tampão fosfato foi preparado com fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) e monobásico (NaH₂PO₄) em iguais proporções. As análises de glutathione total e oxidada foram realizadas usando *Glutathione Colorimetric Assay kit* (ARBOR Assays) seguindo o manual de instruções do fabricante. Além disso, todos os resultados foram normalizados pela quantidade total de proteína das amostras quantificada por *QuantiPro™ BCA Assay kit* (Sigma-Aldrich) seguindo o manual de instruções do fabricante.

Atividade da Catalase. Os músculos do quadríceps femoral foram homogeneizados em solução tampão gelada fornecida por *Catalase Activity Assay kit* (Biovision) na proporção de 50 mg/ 100 µl. Essa análise usou o método colorimétrico e seguiu o manual de instruções do fabricante.

Peroxidação lipídica usando TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico). Os músculos do quadríceps femoral foram homogeneizados com *RIPA Buffer* (Sigma-

Aldrich) na proporção de 25 mg/ 250 µl. Em seguida, TBARS foi quantificado usando *TBARS Colorimetric Assay kit* (Cayman Chemical) seguindo as instruções do fabricante.

Proteína Tiol. Os músculos do quadríceps femoral foram homogeneizados em 100 mM de tampão fosfato na proporção de 10 mg/ 250 µl. Em seguida, foi usado o *Fluorescent Protein Thiol Detection kit* (ARBOR Assays) seguindo as instruções do fabricante para a quantificação de proteína tiol. Além disso, todos os resultados foram normalizados pela quantidade total de proteína quantificada por *QuantiPro™ BCA Assay kit* (Sigma-Aldrich) seguindo o manual de instruções do fabricante.

Análises de imunofluorescência

5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). O reagente BrdU (Sigma-Aldrich) foi diluído em solução salina (PBS – *phosphate buffered saline*) na concentração de 10 mg/ ml. Em seguida, durante os últimos 8 dias do experimento, todos os animais (incluindo o grupo controle) recebeu uma única injeção intraperitoneal (50 mg/ kg) de BrdU. Os camundongos foram anestesiados e submetidos aos procedimentos cirúrgicos descritos previamente. Ambos os músculos gastrocnêmio foram fixados em parafina, cortados na região do ventre muscular em fatias axiais de 5 µm de espessura por um micrótomo e colocados em lâminas de vidro específicas para procedimentos de imuno-histoquímica. Resumidamente, as lâminas de imuno-histoquímica foram desparafinizadas com banhos de etanol de concentrações graduadas e, em seguida, imersas em solução de recuperação de antígeno em um banho de água pré-aquecida a 98 °C durante 30 min. Em seguida, as lâminas de imuno-histoquímica foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente com 0,1% Triton X-100 TBS para a permeabilização da membrana celular, lavadas novamente e incubadas por 30 min em solução de bloqueio de proteínas composto de

3% de BSA (*Bovine Serum Albumin* – Sigma) e 10% de soro de cabra em TBS (*Tris Buffered Saline*). Em seguida, as lâminas de imuno-histoquímica foram coradas com o anticorpo primário anti-BrdU de ovelha (Ab1893 – Abcam, Cambridge, MA) na concentração de 1:50 e selecionado o anticorpo secundário fluorescente anti-ovelha (Alexa Fluor® 647 - Invitrogen) na concentração de 1:200 para se combinar ao anticorpo primário. Finalmente, as lâminas de imuno-histoquímica foram cobertas com meio de montagem contendo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) (Invitrogen). As células positivamente imunomarcadas com BrdU foram fotografadas usando microscópio confocal (Olympus America Inc. Center Valley, PA, USA) a partir de três campos aleatórios de cada lâmina. As imunomarcações por BrdU e DAPI foram quantificadas usando os software Image J (NIH, Bethesda, MD).

Citocromo c oxidase subunidade IV (COX IV). Os músculos gastrocnêmio foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para a realização da imunofluorescência para BrdU. As lâminas de imuno-histoquímica foram coradas com o anticorpo primário anti-COX IV de coelho (Cell Signaling Technology®) na concentração de 1:500 e selecionado o anticorpo secundário fluorescente anti-coelho (Alexa Fluor® 680 – Invitrogen) na concentração de 1:200 para se combinar ao anticorpo primário. As células positivamente imunomarcadas com COX IV foram fotografadas usando microscópio confocal como descrito para BrdU e então o canal vermelho das imagens exportadas foi alterado para a cor amarela.

Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk's W verificou a normalidade da distribuição dos dados. Todos os grupos do estudo submetidos ao protocolo de treinamento foram comparados

em cada sessão de treinamento referente ao número de repetições (escaladas) na escada, trabalho e potência muscular usando análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD. A carga do teste de 3RM entre esses mesmos grupos foi comparada utilizando ANOVA de duas vias (*two-way*) com medidas repetidas (linha de base *versus* final) com *post hoc* de Tukey HSD. Para o conteúdo de ATP muscular, glicogênio, marcadores de estresse oxidativo e análises de imunofluorescência, todos os grupos do estudo foram comparados pela ANOVA de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Desempenho muscular

3RM. A carga final do teste de 3RM foi significativamente maior ($P < 0,05$) comparado à linha de base em todos os grupos do estudo que realizaram treinamento. A carga final do grupo LEDT-Após (92,28 g; EP 0,82) foi significativamente maior que a carga dos grupos LEDT-Placebo (59,58 g; EP 5,28; $P < 0,001$) e LEDT-Antes (78,98 g; EP 1,96; $P = 0,020$). Além desses resultados, o grupo LEDT-Placebo teve significativamente menor carga final ($P < 0,001$) comparado ao grupo LEDT-Antes assim como LEDT-Antes-Após (83,91 g; EP 1,49) [Figura 4 A].

Número de Repetições (escaladas). Houve diferenças significativas entre todos os grupos em cada sessão de treinamento ($P < 0,05$) [Figura 4B]. A 80% de 3RM (primeira sessão): os animais do grupo LEDT-Antes e LEDT-Antes-Após realizaram mais repetições comparados aos animais do grupo LEDT-Placebo e LEDT-Após ($P < 0,01$). A 90% de 3RM (primeira sessão): os animais do grupo LEDT-Placebo realizaram menos repetições que os animais dos grupos LEDT-Antes, LEDT-Antes-Após e LEDT-Após ($P < 0,001$). A 100% de 3RM (terceira sessão): os animais do grupo LEDT-

Placebo realizaram menos repetições comparados aos animais dos grupos LEDT-Antes ($P = 0,014$), LEDT-Antes-Após ($P = 0,010$) e LEDT-Após ($P = 0,002$). A 110% de 3RM (quarta sessão): os animais do grupo LEDT-Placebo realizaram menos repetições que os animais dos grupos LEDT-Antes-Após ($P = 0,013$) e LEDT-Após ($P = 0,009$). A 120% de 3RM (quinta sessão): os animais do grupo LEDT-Após realizaram mais repetições comparados aos animais dos grupos LEDT-Antes ($P = 0,022$) e LEDT-Placebo ($P < 0,001$). Além desses resultados, os animais do grupo LEDT-Placebo realizaram menos repetições que os animais dos grupos LEDT-Antes ($P = 0,022$), LEDT-Antes-Após e LEDT-Após ($P < 0,001$). A 130% de 3RM (sexta sessão): os animais do grupo LEDT-Antes-Após e LEDT-Após realizaram mais repetições comparado aos animais dos grupos LEDT-Placebo ($P < 0,001$) e LEDT-Antes ($P < 0,01$).

Potência Muscular. A 80% de 3RM não houve diferenças significativas entre os grupos submetidos ao programa de treinamento ($P > 0,05$). A 90% de 3RM: os animais do grupo LEDT-Placebo tiveram menor potência muscular comparado aos animais dos grupos LEDT-Antes, LEDT-Antes-Após e LEDT-Após ($P < 0,01$). A 100% de 3RM: os animais do grupo LEDT-Placebo tiveram menor potência muscular comparado aos animais dos grupos LEDT-Antes-Após ($P = 0,025$) e LEDT-Após ($P = 0,007$). A 110% de 3RM: os animais do grupo LEDT-Antes-Após desenvolveram mais potência muscular que os animais do grupo LEDT-Placebo ($P < 0,001$) e LEDT-Antes ($P = 0,013$). Além desses resultados, os animais do grupo LEDT-Após tiveram mais potência muscular comparado aos animais do grupo LEDT-Placebo ($P = 0,002$). A 120% de 3RM: os animais do grupo LEDT-Antes-Após e LEDT-Após desenvolveram mais potência muscular que os animais dos grupos LEDT-Placebo e LEDT-Antes ($P < 0,001$). A 130% de 3RM: os animais do grupo LEDT-Antes-Após desenvolveram mais

potência muscular que os animais dos grupos LEDT-Placebo e LEDT-Antes ($P < 0,001$) e LEDT-Após ($P = 0,001$). Além desses resultados, os animais do grupo LEDT-Após tiveram maior potência muscular que os animais dos grupos LEDT-Placebo ($P < 0,001$) e LEDT-Antes ($P = 0,004$). Finalmente, os animais do grupo LEDT-Antes tiveram maior potência muscular que os animais do grupo LEDT-Placebo ($P = 0,020$) [Figura 4C].

Trabalho Muscular. De maneira similar aos resultados da figura 4B, a 80% de 3RM somente os animais do grupo LEDT-Antes e LEDT-Antes-Após realizaram mais trabalho muscular comparado aos animais do grupo LEDT-Placebo ($P < 0,05$) (Figura 4D). A 90% de 3RM: os animais do grupo LEDT-Placebo realizaram menos trabalho muscular que os animais dos grupos LEDT-Antes, LEDT-Antes-Após e LEDT-Após ($P < 0,001$). Esses resultados foram muito similares a 100% de 3RM ($P < 0,001$). A 110% de 3RM: os animais do grupo LEDT-Placebo realizaram menor trabalho muscular comparado aos animais dos grupos LEDT-Antes-Após ($P = 0,015$) e LEDT-Após ($P = 0,011$). A 120% de 3RM: os animais do grupo LEDT-Placebo realizaram menor trabalho muscular comparado aos animais dos grupos LEDT-Antes ($P = 0,027$) e LEDT-Antes-Após e LEDT-Após ($P < 0,001$). Além desses resultados, os animais do grupo LEDT-Após realizaram maior trabalho muscular que os animais do grupo LEDT-Antes ($P = 0,026$). A 130% de 3RM: os animais dos grupos LEDT-Antes-Após e LEDT-Após realizaram maior trabalho muscular que os animais dos grupos LEDT-Placebo ($P < 0,001$) e LEDT-Antes ($P < 0,01$) [Figura 4D].

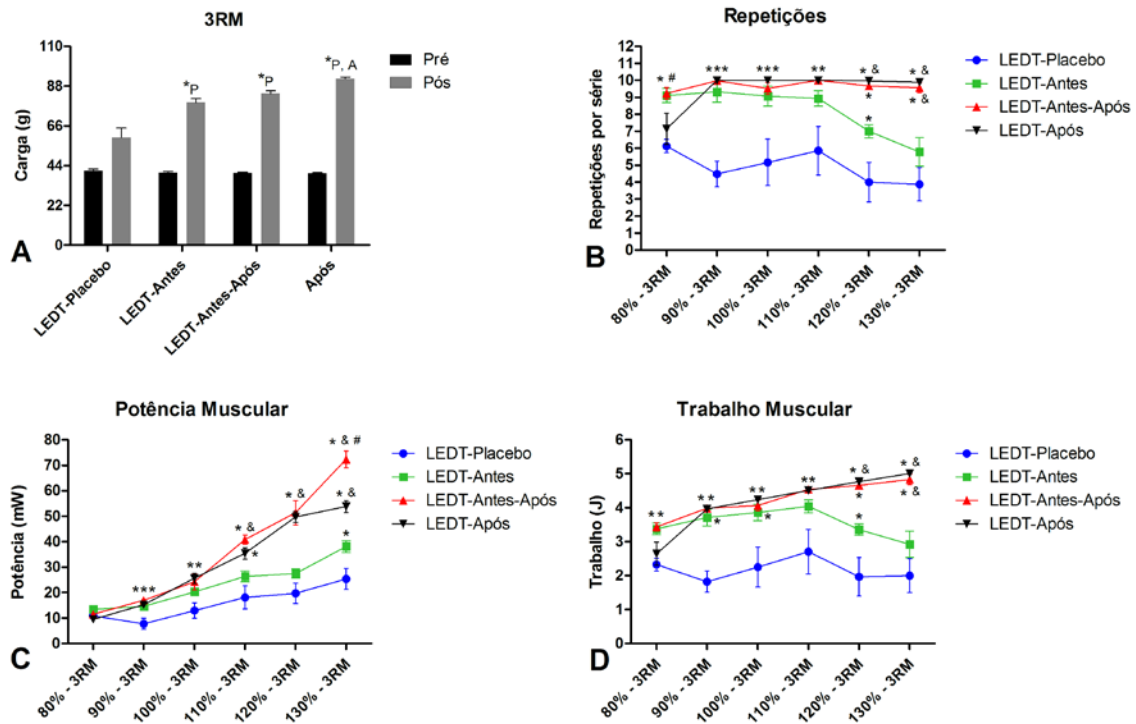


Figura 4 – Desempenho Muscular (n= 5 animais por grupo). **A)** Teste de 3 repetições máximas (3RM) na linha de base (pré) e final (pós) mensurando a carga total carregada pelos animais durante esse teste. *: significância estatística ($P < 0,05$) comparando a carga final do teste de 3RM entre os grupos. **B)** Número de repetições ou escaladas realizadas pelos animais tratados com diferentes regimes de LEDT durante o programa de treinamento progressivo. **C)** Potência muscular desenvolvida pelos animais de cada grupo tratados com diferentes regimes de LEDT durante o programa de treinamento progressivo. **D)** Trabalho muscular desenvolvido pelos animais de cada grupo tratados com diferentes regimes de LEDT durante o programa de treinamento progressivo. * significância estatística ($P < 0,05$) comparada ao grupo LEDT-Placebo. # significância estatística ($P < 0,05$) comparada ao grupo LEDT-Após. & significância estatística ($P < 0,05$) comparada ao grupo LEDT-Antes. Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. A carga do teste de 3RM na linha de base (pré) versus final (pós) foi analisada por análise de variância (ANOVA) de duas vias (*two-way*) com medidas repetidas e *post hoc* de Tukey HSD. Número de repetições (escaladas), trabalho e potência muscular foram analisados por ANOVA de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

Conteúdo de ATP muscular

Os animais do grupo LEDT-Após tiveram significativamente ($P < 0,001$) maior concentração de ATP (1,367.64 nmol/ mg proteína; EP 105,30) comparados aos animais do grupo LEDT-Placebo (15,85 nmol/ mg proteína; EP 5,14), LEDT-Antes (81,00 nmol/ mg proteína; EP 10,11), LEDT-Antes-Após (687,62 nmol/ mg proteína; EP 11,76) e Controle (17,53 nmol/ mg proteína; EP 7,47). Além desses resultados, os animais do grupo LEDT-Antes-Após tiveram também maior conteúdo de ATP comparado aos animais dos grupos LEDT-Antes, LEDT-Placebo e Controle ($P < 0,001$) [Figura 5A].

Conteúdo de Glicogênio Muscular

Os animais do grupo LEDT-Após (137,76 nmol/ mg tecido; EP 11,40) e LEDT-Antes-Após (144,44 nmol/ mg tecido; EP 16,23) tiveram significativamente maiores concentrações de glicogênio nos músculos do quadríceps femoral ($P < 0,001$) comparados ao animais dos grupos LEDT-Placebo (31,36 nmol/ mg tecido; EP 7,45), LEDT-Antes (52,76 nmol/ mg tecido; EP 6,53) e Controle (58,78 nmol/ mg tecido; EP 7,17) [Figura 5B].

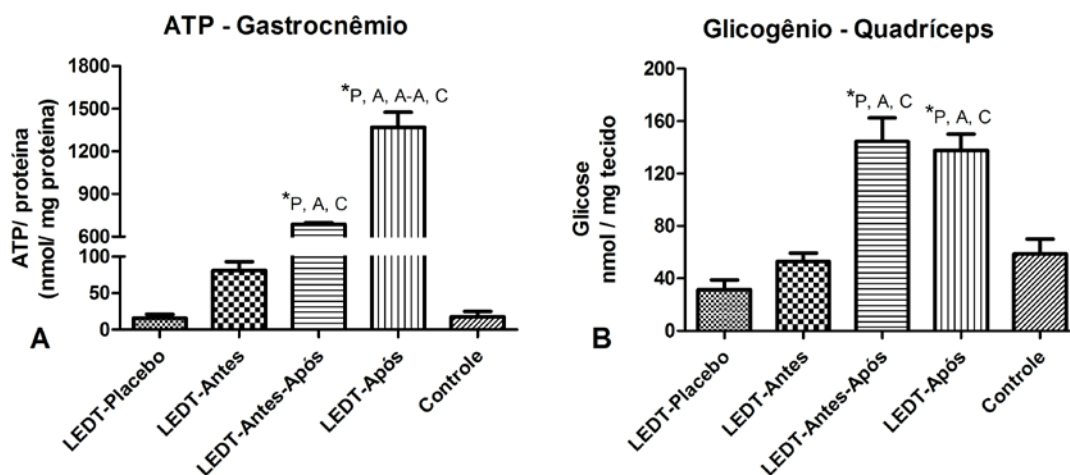


Figura 5 – Conteúdo de ATP Muscular e Glicogênio (n= 5 animais por cada grupo treinado, n= 2 animais no grupo Controle). A) Conteúdo de Adenosina Trifosfato (ATP) no músculo gastrocnêmio após o programa de treinamento. * significância estatística ($P < 0,05$). Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. Controle (C)= grupo controle, ou seja, sem exercício ou avaliação de desempenho muscular. Para as comparações entre todos os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

Marcadores de Estresse Oxidativo

Glutationa Total. Os animais do grupo Controle ($1,33 \mu\text{M}/ \mu\text{g}$ proteína; EP 0,11) tiveram significativamente maior concentração de glutaciona total quando comparados aos animais do grupo LEDT-Placebo ($0,097 \mu\text{M}/ \mu\text{g}$ proteína; EP 0,046; $P = 0,005$) e LEDT-Antes ($1,00 \mu\text{M}/ \mu\text{g}$ proteína; EP 0,02; $P = 0,010$) [Figura 6A].

Glutationa Oxidada. Os animais do grupo LEDT-Placebo ($0,005 \mu\text{M}/ \mu\text{g}$ proteína; EP 0,001) tiveram significativamente menor concentração de glutaciona oxidada quando comparados aos animais dos grupos LEDT-Antes ($0,20 \mu\text{M}/ \mu\text{g}$

proteína; EP 0,002; $P = 0,015$), LEDT-Antes-Após (0,035 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteína; EP 0,003; $P < 0,001$), LEDT-Após (0,041 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteína; EP 0,003; $P < 0,001$) e Controle (0,027 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteína; EP 0,007; $P = 0,006$). Além desses resultados, os animais do grupo LEDT-Antes tiveram significativamente menor concentração de glutatona oxidada comparados aos animais do grupo LEDT-Após ($P < 0,001$) e LEDT-Antes-Após ($P = 0,024$) [Figura 6B].

Proteína Carbonilada. Os animais do grupo LEDT-Após (1,40 nmol/ μg proteína; EP 0,15) tiveram significativamente menores concentrações de proteínas carboniladas comparados aos animais dos grupos LEDT-Placebo (6,31 nmol/ μg proteína; EP 1,09; $P = 0,030$), LEDT-Antes (6,81 nmol/ μg proteína; EP 1,21; $P = 0,040$) e LEDT-Antes-Após (8,27 nmol/ μg protein; EP 2,35; $P = 0,008$) [Figura 6C].

Atividade da Catalase. Os animais do grupo LEDT-Placebo (2,11 nmol/min/ml, EP 0,10) tiveram significativamente menor atividade da catalase ($P < 0,01$) comparados aos animais dos grupos LEDT-Antes-Após (4,33 nmol/min/ml, EP 0,62), LEDT-Após (4,22 nmol/min/ml, EP 0,37) e Controle (4,47 nmol/min/ml, EP 0,52) [Figura 6D].

Peroxidação Lipídica usando TBARS. Não houve diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$). Os animais do grupo Controle tiveram uma concentração de 21,29 μM (EP 1,13); os animais do grupo LEDT-Placebo tiveram 21,12 μM (EP 2,86); os animais do grupo LEDT-Antes tiveram 23,87 μM (EP 1,13); os animais do grupo LEDT-Antes-Após tiveram 19,19 μM (EP 1,01) e os animais do grupo LEDT-Após tiveram 19,55 μM (EP 1,24) [Figura 6E].

Proteína Tiol. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$). Os animais do grupo Controle tiveram 1,79 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteína (EP 0,16); os animais do grupo LEDT-Placebo apresentaram 1,96 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteína (EP 0,14); os animais do grupo LEDT-Antes tiveram 2,02 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteína (EP 0,10); os animais do grupo

LEDT-Antes-Após 1,90 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteína (EP 0,26) e os animais do grupo LEDT-Após tiveram 1,81 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteína (EP 015) [Figura 6F].

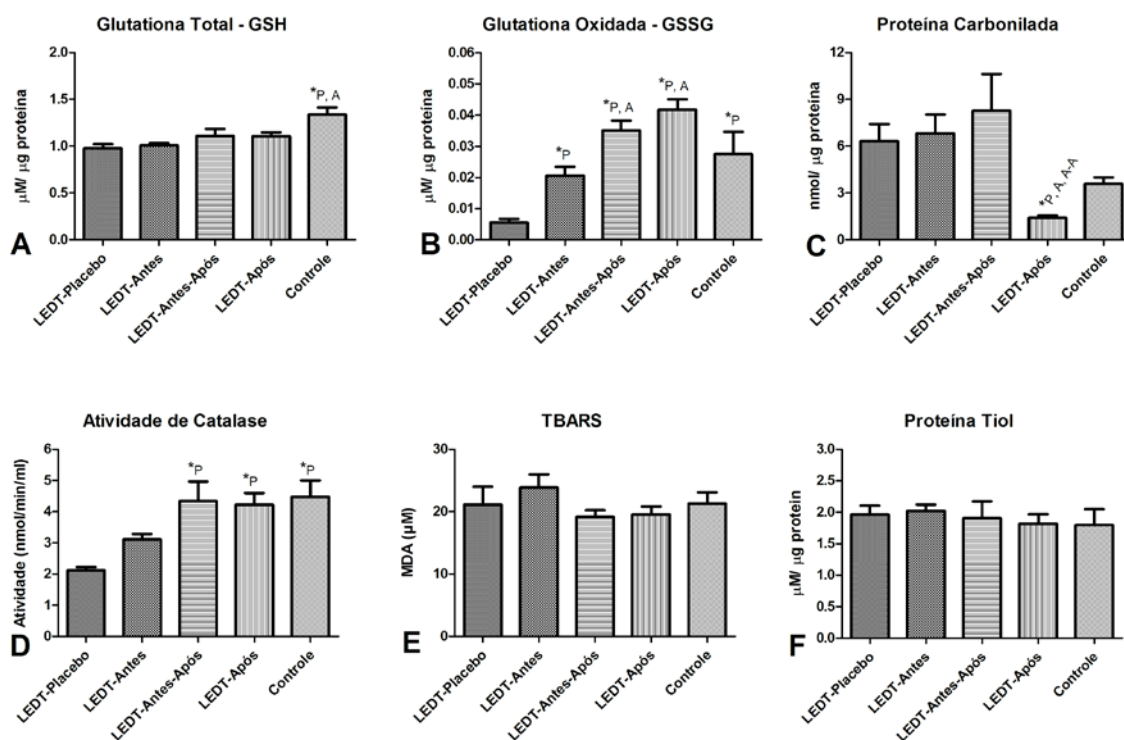


Figura 6 – Marcadores de Estresse Oxidativo no músculo quadríceps femoral (n= 5 animais por cada grupo treinado, n= 2 animais no grupo Controle). A) Glutaciona Total (glutaciona reduzida – GSH). B) Glutaciona Oxidada (GSSG). C) Proteína Carbonilada. D) Atividade da Catalase. E) Peroxidação Lipídica usando TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). F) Proteína Tiol. * significância estatística ($P < 0,05$). Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. Controle (C)= grupo controle, ou seja, sem exercício ou avaliação de desempenho muscular. Para as comparações entre todos os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

Análises de Imunofluorescência

Imunomarcção por BrdU. Os animais do grupo LEDT-Antes-Depois (7,49 UA; EP 1,68) e LEDT-Depois (7,26 UA; EP 0,59) tiveram significativamente ($P < 0,001$) maior imunomarcção para BrdU comparados aos animais dos grupos LEDT-Placebo (1,87 UA; EP 0,37), LEDT-Antes (2,75 UA; EP 0,42) e Controle (0,33 UA; EP 0,21). UA é unidade arbitrária mensurada com o software Image J [Figura 7].

Imunomarcção por DAPI. Os animais do grupo LEDT-Depois (12,85 UA; EP 0,87) e LEDT-Antes-Depois (11,10 UA; EP 1,48) tiveram significativamente ($P < 0,001$) maior imunomarcção por DAPI comparado aos animais dos grupos LEDT-Placebo (4,27 UA; EP 0,83), LEDT-Antes (4,54 UA; EP 0,46) e Controle (3,75 UA; EP 0,45) [Figura 7].

Marcação por BrdU e DAPI

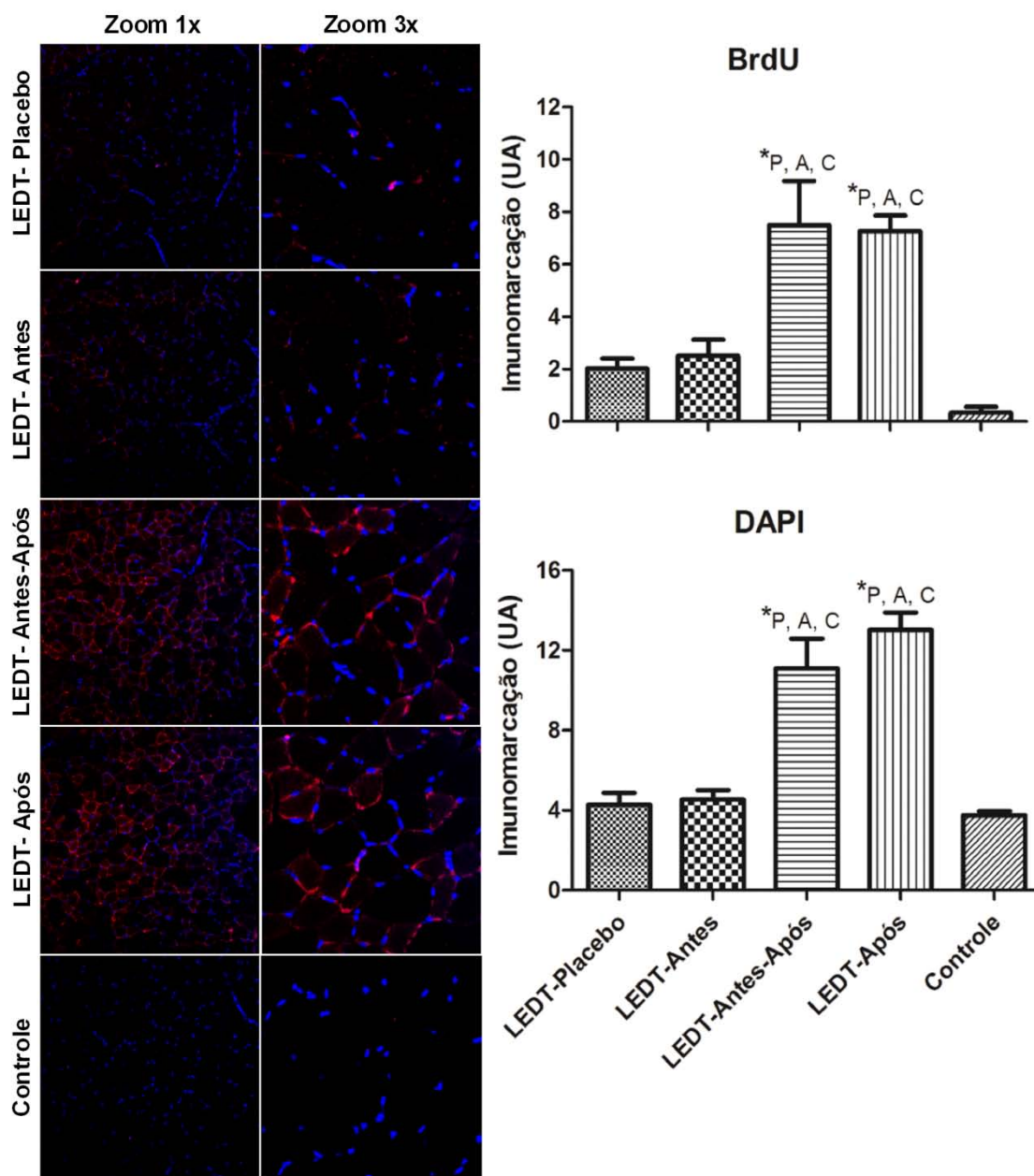


Figura 7 – Células musculares em estado proliferativo e mionúcleos adultos em músculo gastrocnêmio (n= 5 animais por cada grupo treinado; n= 2 animais no grupo Controle). Imunofluorescência para BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) marcou as células musculares em estado proliferativo. Todas as imunomarcações em vermelho indicam novos mionúcleos em formação. Os pontos em cor roxa significam uma mescla de imunomarcção vermelha (novos mionúcleos em formação) e azul (mionúcleos adultos). DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) marcou mionúcleos adultos já formados. As imagens foram fotografadas em microscópio confocal (Olympus America Inc. Center Valley, PA, USA) com uma ampliação de 20x e zoom de 1x e 3x. As imunomarcações para BrdU e DAPI foram quantificadas usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD). * significância estatística ($P < 0,05$). Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo

(equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. Controle (C)= grupo controle, ou seja, sem exercício ou avaliação de desempenho muscular. Para as comparações entre todos os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

Imunomarcção por COX IV. Os animais do grupo LEDT-Antes-Após (11,39 UA; EP 1,54) tiveram significativamente ($P < 0,001$) maior imunomarcção por COX IV comparado aos animais dos grupos LEDT-Placebo (3,74 UA; EP 0,72), LEDT-Antes (4,12 UA; EP 0,71) e Controle (2,18 UA; EP 0,22). Os animais do grupo LEDT-Após (9,00 UA; EP 1,17) tiveram significativamente ($P < 0,01$) maior imunomarcção por COX IV comparado as animais dos grupos LEDT-Placebo, LEDT-Antes e Controle [Figura 8].

Marcação por COX IV

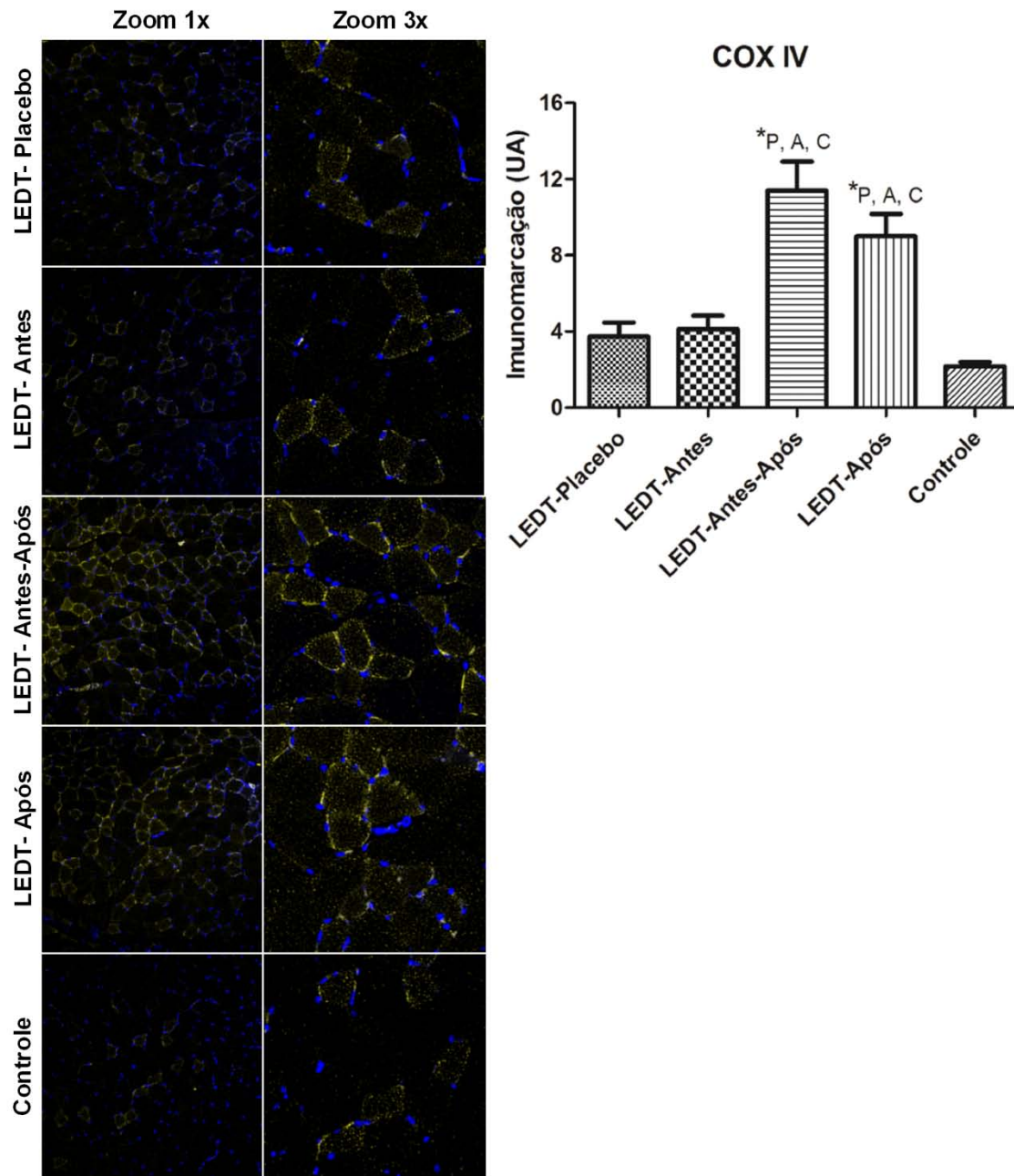


Figura 8 – Metabolismo Mitocondrial no músculo gastrocnêmio (n= 5 animais por cada grupo treinado; n= 2 animais no grupo controle). A análise de imunofluorescência para citocromo c oxidase subunidade IV (COX IV) imunomarcou as células musculares com metabolismo mitocondrial em amarelo. As imagens foram fotografadas em microscópio confocal (Olympus America Inc. Center Valley, PA, USA) com uma ampliação de 20x e zoom de 1x and 3x. COX IV foi quantificada usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD). * significância estatística ($P < 0,05$). Siglas: LEDT= terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT); LEDT-Placebo (Placebo - P) = LEDT placebo (equipamento de LEDT em modo placebo) aplicado sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada inclinada; LEDT-Antes (Antes – A) = LEDT aplicada sobre os músculos

imediatamente antes (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Antes-Após (Antes-Após – A-A) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente antes (5 minutos) e imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada; LEDT-Após (Após – Ap) = LEDT aplicada sobre os músculos imediatamente após (5 minutos) de cada sessão de treinamento em escada. Controle (C)= grupo controle, ou seja, sem exercício ou avaliação de desempenho muscular. Para as comparações entre todos os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) com *post hoc* de Tukey HSD.

DISCUSSÃO

Apesar de estudos prévios já terem reportado sobre os efeitos da fototerapia por laser e LEDs sobre o desempenho muscular em protocolos envolvendo exercícios agudos (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013), bem como durante programas de treinamento (FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012), para o nosso conhecimento esse é o primeiro estudo investigando qual é o melhor momento para usar essa terapia em programa de treinamento, comparando aplicações de terapia LED placebo, terapia LED antes, terapia LED antes e após, e terapia LED após cada sessão de treinamento.

A literatura já nos traz estudos que mostram um aumento no número de repetições e um melhor efeito protetor contra o dano muscular induzido por exercício quando a fototerapia é aplicada sobre os músculos imediatamente antes de uma sessão de exercício de alta intensidade (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014). De acordo com esses estudos prévios, nossos resultados relacionados à primeira sessão de treinamento a 80% de 3RM mostraram um significativo aumento no número de repetições (escaladas) e trabalho muscular (~38%) realizado em ambos os grupos

tratados com LEDT aplicada antes dessa sessão de treinamento. No entanto, esses benéficos efeitos não foram vistos para a potência muscular.

Em contrapartida, o efeito protetor da fototerapia contra o dano muscular induzido pelo exercício mensurado pela diminuição na atividade da creatina quinase (CK) no sangue (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014), poderia arguir contra o desenvolvimento de um melhor desempenho muscular, uma vez que as microlesões ou microdanos oriundos do exercício físico são pensados ser essenciais para a melhora tanto da estrutura, quanto do metabolismo muscular (FOLLAND e WILLIAMS, 2007). Nossos resultados referentes ao desempenho muscular claramente confirmam essa hipótese.

Ambos os grupos tratados com LEDT após cada sessão de treinamento (LEDT-Antes-Depois e LEDT-Depois) desenvolveram significativamente mais potência muscular, repetições (escaladas na escada) e trabalho muscular que os grupos LEDT-Antes na quarta e quinta sessão de treinamento, respectivamente, assim como a partir da segunda sessão de treinamento comparado ao grupo LEDT-Placebo. Além disso, o grupo LEDT-Depois teve a maior carga final no teste de 3RM comparado aos grupos LEDT-Placebo e LEDT-Antes [ver figura 4].

Muitas hipóteses têm sido propostas na literatura para explicar os efeitos da fototerapia sobre o tecido muscular (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). A primeira delas é a estimulação da enzima citocromo c oxidase (expressão da proteína e/ou atividade enzimática) que conseqüentemente pode melhorar a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e aumentar a síntese de ATP (KARU, 1999; KARU *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2009). Os nossos resultados das análises de imunofluorescência para a citocromo c oxidase subunidade IV (COX IV) no músculo

gastrocnêmio sugerem fortemente um aumento na atividade mitocondrial principalmente quando a LEDT é aplicada após cada sessão de treinamento. A imunomarcagem para COX IV nos grupos LEDT-Antes-Após e LEDT-Após foi aproximadamente 2,5 vezes maior que no grupo LEDT-Antes, LEDT-Placebo ou o grupo Controle, confirmando a hipótese relacionada ao aumento da atividade mitocondrial e sugerindo maior síntese de ATP pelo metabolismo aeróbio.

Confirmando essa hipótese, o conteúdo de ATP no músculo gastrocnêmio do grupo LEDT-Após surpreendentemente aumentou cerca de 80 vezes comparado ao grupo Controle, assim como aumentou 85 vezes comparado ao grupo LEDT-Placebo, 16 vezes comparado ao grupo LEDT-Antes e 2 vezes comparado ao grupo LEDT-Antes-Após. Esses resultados reforçam fortemente duas ideias reportadas previamente na literatura sobre fototerapia e desempenho muscular: (1) a fototerapia pode aumentar a síntese de ATP nas células (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995; KARU, 1999; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012), resultando em mais energia que inclui a resíntese de fosfocreatina (FERRARESI *et al.*, 2011) e conduz para um melhor metabolismo celular que conseqüentemente melhora o desempenho muscular em termos de: força, potência, repetições, trabalho, resistência à fadiga e uma recuperação pós-exercício mais rápida (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013); e (2) a fototerapia produz melhores respostas quando as células ou tecidos são submetidos a algum estresse metabólico ou mecânico (SOMMER *et al.*, 2002; KARU, 2013).

O presente estudo também avaliou o conteúdo de outra importante fonte de energia para os músculos, o glicogênio (ALLEN; LAMB e WESTERBLAD, 2008). O grupo LEDT-Após e LEDT-Antes-Após tiveram conteúdos de glicogênio muito similares, aumentando cerca de 4,5 vezes comparado ao grupo LEDT-Placebo; cerca de

2,6 vezes comparado ao grupo LEDT-Antes; e cerca de 2,4 vezes comparado ao grupo Controle. Esses resultados sugerem que o conteúdo de glicogênio muscular pode ser restabelecido rapidamente e ainda aumentado quando a fototerapia é aplicada após os exercícios, sugerindo efeitos da LEDT sobre o metabolismo da glicose em todos os passos da glicólise, bem como possivelmente aumentando a atividade de transportadores de glicose nas células (transportador de glicose tipo 4). Em resumo, os nossos resultados sugerem que ATP e glicogênio podem ser aumentados, restabelecidos rapidamente e se tornarem mais disponíveis para as células musculares em cada sessão de treinamento se a LEDT é aplicada após uma sessão de exercício.

A literatura também tem relatado a importância do equilíbrio entre a produção e a redução de espécies reativas de oxigênio (EROS), conhecido como estresse oxidativo, para alcançar um melhor desempenho muscular bem como prevenir dano celular após exercício intenso (POWERS e JACKSON, 2008). Nesse contexto, o efeito da LEDT em proteger contra o dano muscular induzido por exercício tem sugerido uma modulação de EROS (SILVEIRA *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2013) produzida naturalmente durante o exercício (POWERS e JACKSON, 2008; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012) e por essa razão nós investigamos vários marcadores de estresse oxidativo nesse presente estudo: proteínas carboniladas, glutathione (total e oxidada), catalase, peroxidação lipídica usando TBARS (conteúdos de malondialdeído – MDA) e proteína tiol. O conteúdo de proteína carbonilada foi significativamente diminuído somente no grupo LEDT-Após, promovendo uma efetiva proteção contra a oxidação de proteína e lesão assim como sugerindo melhor função proteica (BANERJEE *et al.*, 2003; FINAUD; LAC e FILAIRE, 2006; POWERS e JACKSON, 2008). As proteínas carboniladas foram investigadas nesse presente estudo porque elas são formadas rapidamente após uma situação de estresse oxidativo e são estáveis por

horas ou dias, tornando-se um específico e confiável marcador de estresse oxidativo (BANERJEE *et al.*, 2003). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo mensurando proteínas carboniladas como um marcador de estresse oxidativo de músculos tratados com LEDT.

Confirmando nossas hipóteses sobre o equilíbrio do estresse oxidativo, o conteúdo de glutathiona total (GSH) foi significativamente movido para a forma oxidada (GSSH) no grupo LEDT-Antes comparado aos animais do grupo LEDT-Placebo; o grupo LEDT-Antes-Após comparado ao LEDT-Placebo e LEDT-antes assim como LEDT-Após comparado aos grupos LEDT-Placebo e LEDT-Antes. Esses resultados podem ter ocorrido devido ao aumento da atividade ou aumento da regulação da atividade enzimática de glutathiona peroxidase (GPX) (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012), responsável por oxidar GSH a GSSH durante o processo de redução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (BANERJEE *et al.*, 2003; FINAUD; LAC e FILAIRE, 2006; POWERS e JACKSON, 2008). Além disso, o conteúdo muscular de GSH foi significativamente maior no grupo Controle comparado aos grupos LEDT-Placebo e LEDT-Antes, mas sem significância estatística comparada aos grupos tratados com LEDT após cada sessão de treinamento. Esses resultados sugerem que a LEDT após os exercícios minimiza o estresse oxidativo trazendo-o para níveis similares aos do grupo controle (sem exercício) ou aos níveis normais. A atividade da catalase nos grupos LEDT-Após, LEDT-Antes-Após e Controle foi significativamente maior comparada ao grupo LEDT-Placebo, corroborando a ideia de melhor defesa contra o estresse oxidativo com o uso da LEDT (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012).

Nós avaliamos outros marcadores de estresse oxidativo incluindo o nível de peroxidação lipídica usando TBARS (conteúdo de malondialdeído – MDA) e proteína

tiol. Durante o estresse oxidativo, MDA é formado a partir do ataque de radicais livres aos ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana celular, o que pode conduzir a prejuízos do controle celular dos gradientes iônicos e transporte de Ca^{2+} (FINAUD; LAC e FILAIRE, 2006; POWERS e JACKSON, 2008). Uma diminuição dos níveis de proteína tiol tem sido usada como um alternativo marcador de estresse oxidativo quando a produção de EROS é crônica, ou seja, quando permanece por semanas e meses (BANERJEE *et al.*, 2003; FINAUD; LAC e FILAIRE, 2006; POWERS e JACKSON, 2008). No entanto, o conteúdo de MDA foi muito similar entre os grupos e não apresentou diferenças estatísticas significativas nesse estudo, contrastando com estudos prévios (SILVEIRA *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2013), assim como não houve diferença significativa nos conteúdos de proteína tiol. Esses resultados associados aos resultados de proteínas carboniladas, glutatona e atividade da catalase sugerem que houve um estresse oxidativo produzido durante o protocolo de exercício, mas este estresse foi insignificante para produzir danos na membrana celular e também não foi prolongado (semanas e meses).

Além da disponibilidade de energia para a contração muscular e menor estresse oxidativo, o desempenho muscular em programas de treinamento depende também de quão rápido ocorre o processo de recuperação de microlesões ou pequenos danos musculares (FOLLAND e WILLIAMS, 2007). Após as microlesões e pequenos danos do tecido muscular, ocorre a ativação células satélites e a adição de novos mionúcleos nas células musculares é responsável por permitir um aumento na síntese de proteínas que conduz ao reparo tecidual e à hipertrofia muscular (PETRELLA *et al.*, 2008; NAKANO *et al.*, 2009). Considerando essas questões muito importantes, esse presente estudo também avaliou a formação de novos mionúcleos por meio da incorporação de BrdU dentro do DNA das células musculares para evidenciar a presença de miócitos em

fase de mitose (proliferação) (NAKANO *et al.*, 2009), assim como avaliou a imunomarcção de mionúcleos já formados (ou adultos) por meio de DAPI. Nossos resultados confirmam um aumento na imunomarcção por BrdU e DAPI quando a fototerapia foi aplicada, principalmente, após cada sessão de treinamento, sugerindo um aumento na proliferação de células musculares possivelmente pela ativação de células satélites (NAKANO *et al.*, 2009; FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012). Esse resultado implica em uma rápida síntese de novas proteínas musculares para reparar o dano muscular oriundo de exercícios intensos (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012), assim como mais mionúcleos por célula muscular que conduz a um melhor domínio mionuclear (PETRELLA *et al.*, 2008).

A fototerapia por laser e LEDs exibe uma dose-resposta bifásica a qual é responsável por promover efeitos benéficos se a dose de luz estiver acima do limiar necessário para estimular os processos biológicos, mas essa dose de luz também precisa estar abaixo de um limiar limítrofe no qual ocorre inibição dos processos biológicos (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011). Esse presente estudo utilizou uma dose de luz baseada nessa possível resposta bifásica (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011) e de acordo com estudos prévios em modelos experimentais (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2014). Além disso, os estudos prévios tem geralmente usado comprimentos de onda na faixa do vermelho ou na faixa do infravermelho próximo de forma isolada, mas o uso de dois comprimentos de onda simultaneamente pode ser benéfico. Com essa perspectiva em mente, tanto os comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho próximo emitidos por LEDs foram usados nesse estudo a fim de otimizar a absorção da luz por meio de uma dupla banda de absorção (KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010) pelos cromóforos localizados dentro das células,

especialmente dentro da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial para conduzir maior produção de ATP (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995; KARU, 1999).

Esse estudo tem mostrado uma evidente melhora no desempenho muscular, metabolismo energético, defesa antioxidante e reparo/ proliferação de células musculares com diferentes momentos de aplicação da LEDT sobre os músculos associado a um programa de treinamento. Os principais aprendizados desse estudo são: (a) se a proposta é melhorar o desempenho muscular antes de uma única sessão de exercício agudo, como uma única competição atlética, a LEDT deve ser aplicada antes do exercício; (b) se a proposta é desenvolver um melhor e duradouro desempenho muscular então se deve adotar um programa de treinamento apropriado para o esporte específico e combiná-lo com aplicações de LEDT sobre toda a extensão dos músculos envolvidos na atividade física (FERRARESI *et al.*, 2011) após cada sessão de treinamento (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012). Os nossos resultados podem ser facilmente aplicados em humanos, onde a LEDT pode ser usada para acelerar a recuperação muscular após lesões, bem como melhorar o desempenho muscular nos exercícios (LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012).

**Efeitos do laser de baixa intensidade sobre a modulação da expressão
gênica global de homens jovens sob treinamento físico de força**

RESUMO

Contexto e Objetivos: As terapias laser (*low-level laser therapy – LLLT*) e LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*) de baixa intensidade têm sido utilizadas para o aumento de desempenho muscular em modelos experimentais e estudos clínicos. No entanto, os mecanismos de ação dessa terapia no tecido muscular, sobretudo em humanos, ainda não estão totalmente elucidados. Nesse estudo investigamos a efetividade da LLLT no aumento do desempenho muscular e a modulação da expressão gênica desse tecido, uma vez que a relação entre desempenho muscular e os níveis de expressão gênica são bem estabelecidos na literatura.

Desenho do estudo/Materiais e métodos: Participaram do estudo 36 homens jovens, clinicamente saudáveis e fisicamente ativos. Todos foram alocados randomicamente em três grupos iguais: grupo controle (CC); grupo treinamento (GT) e grupo treinamento associado à LLLT (GTL). Os grupos GT e GTL treinaram com carga de 80% de 1 repetição máxima em *leg press* (1RM) durante 12 semanas consecutivas em *leg press*. A LLLT (808 nm; 60 mW; 25,2 J) foi aplicada sobre todo o quadríceps femoral dos voluntários do GTL imediatamente após o término de cada treinamento. O desempenho muscular foi avaliado em testes de 1RM e dinamometria isocinética. A modulação da expressão gênica de todo o genoma foi investigada por *microarrays*.

Resultados: O grupo GTL teve o melhor desempenho muscular no teste de 1RM e dinamometria isocinética após o programa de treinamento, quando comparado ao GT. Mais de 1.600 genes foram diferencialmente expressos no GTL e mais 1.200 no GT. Dentre esses muitos genes, o GTL aumentou a expressão de vias de proliferação celular e hipertrofia muscular (ERK, AKT1, mTOR), genes mitocondriais (Cox, ATP5C1) e diminuiu vias de atrofia muscular (TRIM63 e MSTN). O GT diminuiu a expressão de FIS1 (fissão mitocondrial) e aumentou ATP5F1 (complexo V mitocondrial). Nas comparações entre GT e GTL, houve aumento na expressão de genes referentes às células satélites musculares e mitocondriais, bem como diminuição de expressão de genes de atrofia muscular no grupo GTL.

Conclusão: A LLLT aumenta o desempenho muscular após programa de treinamento físico e modula a expressão de genes de forma global: proliferação celular, hipertrofia e atrofia muscular, mitocôndrias e células satélites musculares.

Palavras-chave: LLLT, LEDT, microarrays, treinamento, biópsia.

INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos da literatura sobre a interação-luz tecido biológico reportam a absorção da luz emitida por lasers de baixa intensidade por meio da citocromo c oxidase (Cox), que é uma enzima importante da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995; KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 2004). A absorção da luz pela Cox, considerado o efeito primário, conduziu a mudanças nas taxas de síntese de adenosina trifosfato (ATP) em hepatócitos (PASSARELLA *et al.*, 1984) e também em células de câncer cervical (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995), além de modular o potencial de membrana mitocondrial (PASSARELLA *et al.*, 1984), sugerindo mudanças no metabolismo dessa organela.

A partir dessas modulações, conhecidas como fotobiomodulação, os efeitos da laserterapia de baixa intensidade (*low-level laser therapy – LLLT*) e também da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*) foram investigados com maior detalhamento e foi sugerido que os efeitos primários da LLLT (absorção da luz pela Cox) conduziram a efeitos secundários, como mudanças nas taxas de síntese de DNA e RNA pelas células em função do aumento da síntese de ATP (KARU, 1999). Nesse contexto, foi demonstrado também que a luz emitida pela LEDT é absorvida pela Cox aumentando a atividade dessa enzima *in vivo* (HAYWORTH *et al.*, 2010). A partir desse momento, podemos observar que a luz emitida por lasers e LEDs (fototerapia) pode produzir efeitos semelhantes de fotobiomodulação mediado pela Cox (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012).

O fenômeno da fotobiomodulação também foi investigado quanto às modulações de expressão gênica mediadas pela fototerapia de baixa intensidade (luz emitida por lasers e LED), sobretudo relacionadas ao metabolismo celular (ZHANG *et al.*, 2003;

MASHA; HOURELD e ABRAHAMSE, 2013). Nesse contexto, um dos estudos de grande importância na literatura foi o conduzido por ZHANG *et al.* (2003), o qual identificou o fenômeno da fotobiomodulação em fibroblastos após a irradiação com laser vermelho (628 nm). A fotobiomodulação reportada nesse estudo foi a modulação da expressão de 111 genes de diferentes funções que, dentre essas funções, destacaram-se a superexpressão de genes relacionados à proliferação celular e inibição ou menor expressão de genes relacionados à apoptose celular.

Mais recentemente foi demonstrado que a fototerapia por laser (LLLT) também na faixa do vermelho (660 nm) foi capaz de modular a expressão de genes relacionados à cadeia transportadora de elétrons em cultura de fibroblastos, principalmente dos transcritos relacionados à enzima Cox e ao complexo ATP sintase (complexo V) (MASHA; HOURELD e ABRAHAMSE, 2013), confirmando resultados prévios sobre a interação da luz com as mitocôndrias celulares (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005). Nesse contexto, além da modulação da expressão de genes mitocondriais, a LLLT parece influenciar a expressão de diversas vias de sinalizações celulares (GAO e XING, 2009).

Recentemente a fototerapia por lasers e LEDs tem sido utilizada para o aumento de desempenho muscular em modelos experimentais, bem como em estudos clínicos (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Os estudos incluídos nessas três revisões da literatura sobre essa temática apontam para uma efetividade da fototerapia no aumento do número de repetições nos exercícios, redução de fadiga e proteção contra o dano muscular. Diversos mecanismos já foram investigados para se elucidar esses efeitos, como a quantificação de metabólitos de vias do metabolismo energético como o lactato, enzimas do metabolismo energético como a lactato desidrogenase (VIEIRA *et al.*, 2006)

e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (DE MARCHI *et al.*, 2012). No entanto, nenhum estudo investigou os efeitos de um programa de treinamento físico associado à LLLT sobre a modulação da expressão gênica de tecido muscular em humanos.

Dessa maneira, nesse presente estudo foi conduzido um programa de treinamento de força (80% da carga de 1 repetição máxima em *leg press* – 1RM) durante 12 semanas em *leg press* associado ou não à LLLT aplicada após cada sessão de treinamento para se avaliar a modulação da expressão gênica do tecido muscular. Homens jovens, saudáveis e fisicamente ativos participaram desse estudo. Avaliações iniciais e finais de 1RM em *leg press* e dinamometria isocinética avaliaram o desempenho muscular dos voluntários; e a perimetria da coxa avaliou os incrementos de volume da coxa após o programa de treinamento. Antes e após o programa de treinamento foram realizadas biópsias musculares para se analisar a modulação da expressão gênica do tecido muscular. Porém, uma vez que não há estudos na literatura reportando quais genes possivelmente seriam responsivos ao treinamento associado à LLLT, decidimos realizar análises globais (todo o genoma humano) por meio de *microarrays*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo e declaração de ética

O presente estudo foi clínico, controlado e randomizado. Foram inscritos homens jovens, fisicamente ativos e submetidos a treinamento físico de força por um período de 12 semanas. A figura 1 representa o desenho experimental e organização das avaliações realizadas durante todo o estudo. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (número de protocolo 040/2011 – *Apêndice I*) e registrado no Clinical Trials

(NCT01784432). Os voluntários foram recrutados entre os estudantes de graduação da UFSCar e todos foram informados sobre os objetivos do estudo, procedimentos e, após a admissão ao experimento, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

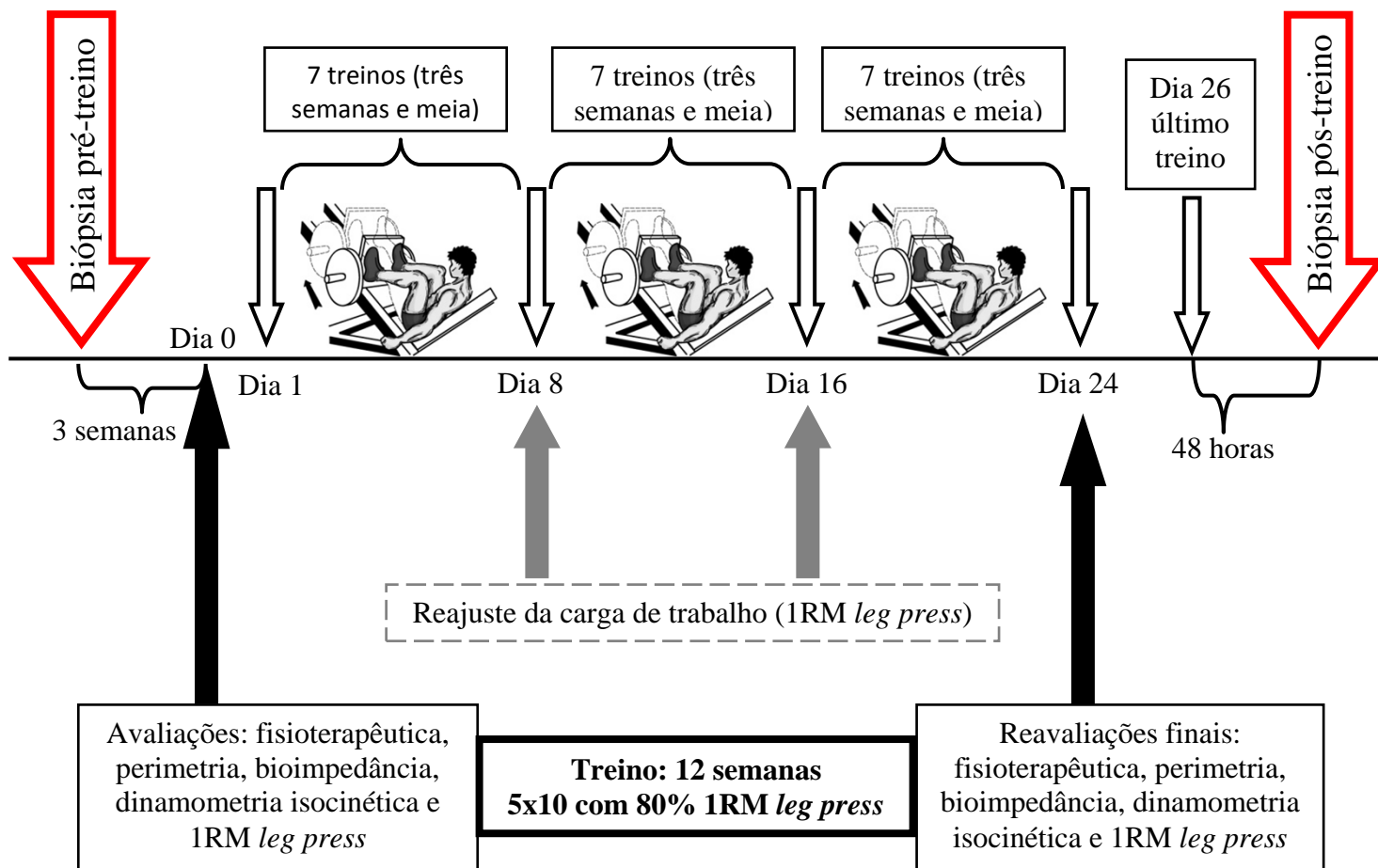


Figura 1: Desenho experimental do estudo.

Voluntários, critérios de inclusão e exclusão

Trinta e seis estudantes fizeram parte desse estudo e declararam ser saudáveis. Os critérios de inclusão desse estudo foram: idade entre 18 e 25 anos, massa corpórea entre 65 e 100 Kg, IMC inferior a 26kg/m^2 , altura entre 1,60 e 1,90 m, clinicamente saudáveis, sedentários e/ou fisicamente ativos, portanto não atletas conforme CASPERSEN; PEREIRA e CURRAN (2000) e WAWRZYNIAK *et al.* (1996). Os critérios de exclusão foram: história prévia de algum grau de lesão muscular no quadríceps femoral (6 meses prévios ao estudo), e/ou problemas no sistema cardiovascular, e/ou osteomioarticular, e/ou presença de doenças sistêmicas, como doenças metabólicas (exemplo: diabetes mellitus), durante as avaliações iniciais.

Randomização e grupos do estudo

Os 36 voluntários aptos a participarem do estudo foram alocados randomicamente (sorteio) em três grupos iguais: GC (grupo controle), GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade). Entretanto, houve desistência de dois voluntários do grupo GC, um do grupo GT e outro do grupo GTL. Também, um voluntário do grupo GT e outro do grupo GTL se lesionaram durante o programa de treinamento físico e não puderam cumprir todo o programa pré-estabelecido de treinamento (12 semanas). Estes voluntários cumpriram 9 e 10 semanas, respectivamente. Portanto, o tamanho amostral do estudo foi de 30 voluntários.

Instrumentos

Foi utilizado um *leg press* inclinado a 45° para o teste de uma repetição máxima (1RM); goniômetro para a determinação do ângulo de flexão do joelho no teste de

1RM; metrônomo digital para a padronização dos tempos de contrações musculares concêntricas e excêntricas durante o período de treinamento; um dinamômetro isocinético computadorizado (*Biodex, Multi-Joint System III* – New York – USA) para o registro das variáveis isocinéticas de desempenho muscular; fita métrica para mensurar a perimetria da coxa dos voluntários; 8 agulhas metálicas para biópsias musculares; lâmina de bisturi número 11; lidocaína a 2% sem vasoconstrictor para anestesia local durante os procedimentos de biópsia muscular; reagentes para análise de expressão gênica por *microarrays* e 5 slides de 4x44K cada com sequencias complementares de 41.000 genes humanos transcritos e representados por oligonucleotídeos de 60 mer da plataforma Agilent (Agilent, Santa Clara – CA, USA); RNeasy Mini Kit(50) Cat N° 74104 para purificação (*clean-up*) das amostras de RNA mensageiro (mRNA) (QIAGEN Brasil, São Paulo, BRA).

Protocolos de avaliação, treinamento e laserterapia de baixa intensidade

Perimetria da coxa: A perimetria da coxa foi mensurada entre a meia distância da espinha ilíaca anterossuperior e a base da patela do membro inferior dominante de cada sujeito. O membro inferior dominante foi determinado como aquele utilizado para chutar uma bola com maior precisão. Essa avaliação foi realizada na posição ortostática e os músculos da coxa relaxados. A perimetria foi mensurada somente no início e final do estudo.

Avaliação em dinamômetro isocinético (BIODEX): Primeiramente os voluntários realizaram um breve aquecimento (5 minutos) em bicicleta ergométrica (*Ergo-FIT – Ergo 167 Cycle*, Pirmasens, DEU) com carga de 100 W. Em seguida os voluntários foram posicionados no dinamômetro isocinético, o qual foi previamente calibrado. Os

indivíduos assumiram uma postura devidamente alinhada e estabilizada por cintos com a finalidade de evitar possíveis movimentos compensatórios, conforme instruções do fabricante. A avaliação foi realizada apenas no membro inferior dominante do voluntário e o eixo de rotação do dinamômetro foi ajustado com o eixo do joelho desse mesmo membro avaliado (ao nível do epicôndilo lateral do fêmur). O quadril foi estabilizado em flexão de 80° e o braço de alavanca do equipamento fixado aproximadamente a 1 cm proximal do maléolo tibial. Parâmetros como altura e base da cadeira, distância do espaldar, nível do assento e base do dinamômetro foram ajustados para cada indivíduo. Antes do início da avaliação, foi realizada uma familiarização ao aparelho que incluiu a realização de três contrações musculares concêntricas voluntárias submáximas, em toda a amplitude de movimento padronizada e pré-programada (0°-70°), com velocidade constante de 60°/s. Após 3 minutos de repouso, o teste foi iniciado com a realização de 2 séries de cinco contrações concêntricas voluntárias máximas e recíprocas do quadríceps femoral e isquiotibiais, separadas por um intervalo de 3 minutos entre cada uma, do quadríceps femoral e isquiotibiais, em toda a amplitude de movimento de flexão-extensão do joelho padronizada e pré-programada [Figura 2]. Encorajamento verbal e visual foi dado aos voluntários para se alcançar o máximo de esforço. A avaliação do torque isocinético foi mensurada em Pico de Torque (PT – maior torque gerado entre as duas séries da avaliação) e Média de Pico de Torque (MPT – média dos picos de torque gerados nas duas séries da avaliação), Potência extensora (POT – média entre as duas séries da avaliação) e o Trabalho extensor (TRAB – média das duas séries da avaliação) dos músculos extensores do joelho. Foram realizadas todas as avaliações propostas para a identificação de alterações na força (torque), potência e trabalho isocinético dos músculos extensores do joelho de todos os voluntários dos grupos GC, GT e GTL nos períodos pré e pós-treinamento físico. Vale ressaltar que os

dados dessa avaliação foram somente aceitos se apresentassem um coeficiente de variação menor que 10% (DAWN T. GULICK *et al.*, 1998/1999).



Figura 2. Posicionamento do voluntário no dinamômetro isocinético (lado esquerdo da figura) e amplitude de movimento desenvolvida na avaliação isocinética (lado direito da figura).

Teste de uma repetição máxima em *leg press* (1RM): Para essa avaliação foi utilizado um *leg press* com inclinação de 45°. Primeiramente foi realizado um breve aquecimento (5 minutos) em bicicleta ergométrica (*Ergo-FIT – Ergo 167 Cycle*, Pirmasens, DEU) com carga de 100 W. Em seguida foi demonstrada, pelo avaliador, a técnica de levantamento da carga no teste. A carga máxima imposta para a realização da contração muscular excêntrica/ concêntrica em *leg press* 45° foi escolhida de forma subjetiva, respeitando-se o limite de cinco tentativas e intervalos de 3 a 5 minutos entre cada uma delas, evitando disfunções metabólicas que prejudicassem a qualidade do teste. Para as avaliações pré-treinamento físico, foi realizada uma familiarização ao aparelho que consistiu de 10 repetições com uma carga aleatória, estimada subjetivamente e inferior a 60% da 1RM. Essa carga subjetiva foi identificada de acordo com o grau de esforço

físico que o voluntário realizou na familiarização ao aparelho, seguindo-se a escala de OMNI, onde 0 corresponde a extremamente fácil e 10 extremamente difícil (IRVING *et al.*, 2006). Também foram padronizadas a posição de início, final e a amplitude do movimento (90° a 0°), com auxílio de goniômetro e uma marcação (em centímetros) no aparelho de *leg press*, reduzindo a variabilidade nos resultados do teste. Foram realizadas todas as avaliações propostas para a identificação de alterações na carga máxima de trabalho de todos os voluntários dos grupos GC, GT e GTL nos períodos pré e pós-treinamento físico. A figura 3 ilustra essa avaliação.



Figura 3. Posicionamento do voluntário no teste de uma repetição máxima em *leg press* (1RM) (lado esquerdo da figura) e determinação da amplitude de movimento nessa avaliação (centro e lado direito da figura).

Treinamento: Após 2 dias das avaliações iniciais de perimetria, dinamometria isocinética e 1RM, os voluntários dos grupos GTL e GT iniciaram um programa de treinamento físico de força, baseado na literatura científica específica (WERNBOM; AUGUSTSSON e THOME, 2007; RATAMESS *et al.*, 2009). O programa de treinamento consistiu de dois treinos semanais em *leg press* inclinado a 45° em dias não consecutivos. O período total do treinamento foi de 12 semanas consecutivas (3 meses), totalizando 24 sessões. A intensidade do treinamento foi sempre de 80% da 1RM e o

volume do treino de 50 repetições, dividido em 5 séries de 10 repetições cada. Caso o voluntário não conseguisse completar as 10 repetições de cada série, ele realizava o número máximo de repetições até a sua falha muscular concêntrica durante essa série e lhe era concedido o intervalo de repouso. O intervalo de repouso entre as séries foi de 2 minutos e os sujeitos foram instruídos quanto à velocidade da realização do exercício por meio de um metrônomo: 2 segundos de contração muscular excêntrica para 1 segundo de concêntrica (WERNBOM; AUGUSTSSON e THOMEE, 2007). Todos os treinos foram monitorados quanto à temperatura ambiente (23-26 °C) e à amplitude de movimento desenvolvida nos testes de 1RM e durante o treinamento em *leg press*, validando a carga dos testes de 1RM e cada treino. Os ajustes da carga de trabalho foram realizados por meio de reavaliações da 1RM a cada 8 treinos, sempre no mesmo período do dia que o sujeito estabeleceu para treinar e, dessa forma, o substituiu. Dois dias após o 24º treino, os sujeitos foram submetidos às avaliações finais de perimetria da coxa, dinamometria isocinética e 1RM.

Laserterapia de baixa intensidade (*low-level laser therapy – LLLT*): Os sujeitos do grupo GTL foram submetidos a um protocolo de fototerapia por laser de baixa intensidade imediatamente após cada sessão de treinamento [Figura 4]. O tratamento com laser infravermelho foi através da técnica de contato; feixe estacionado e perpendicular com a pele dos sujeitos; por 24 dias; sobre 7 regiões distribuídas no ventre do músculo quadríceps femoral de cada membro inferior, sobre área previamente demarcada (primeira região a 10 cm abaixo da espinha ilíaca anterossuperior e as demais regiões distribuídas equidistantemente até o fim do músculo vasto medial, próximo ao polo superior da patela) e registrada como forma de tornar as sessões de

aplicação do laser mais uniformes. Os parâmetros da LLLT no estudo foram: aparelho na faixa do infravermelho próximo (808nm), contendo seis diodos dispostos transversalmente e com potência de 60 mW cada; modo contínuo; área do feixe de 0,0028 cm²; energia por ponto (diodo) de 0,6 J; energia total por sessão em cada membro inferior foi de 25,2 J e a total de 50,4J (ambos os membros); densidade de energia ou fluência por diodo de 214,28 J/cm²; densidade de potência por diodo de 21,42 W/cm² e tempo de aplicação de 70 segundos por membro e 140 segundos no total (ambos os membros).



Figura 4. Aplicação da laserterapia de baixa intensidade (*low-level laser therapy – LLLT*) sobre a coxa dos voluntários imediatamente após uma sessão de treinamento.

Biópsia muscular: Foram realizadas biópsias musculares nos períodos pré e pós-treinamento físico dos voluntários dos grupos GT e GTL. Previamente à biópsia, foi realizada a assepsia e anestesia local utilizando lidocaína a 2% sem vasoconstrictor

[Figura 5]. Em seguida, foi demarcada a região da retirada do fragmento muscular. O fragmento do músculo vasto lateral foi obtido na metade da distância entre uma linha imaginária de início no trocânter maior até o ápice da patela (SCHILLING *et al.*, 2005). O ponto exato para a retirada do fragmento do músculo foi a 15 cm acima da borda superior da patela [Figura 6]. Após a marcação, foi realizada uma pequena incisão, de aproximadamente 0,5 cm na pele, tecido subcutâneo e fáscia muscular utilizando uma lâmina de bisturi nº11 (SCHILLING *et al.*, 2005) [Figura 7]. Posteriormente, foi inserida agulha de biópsia 4,5mm para a obtenção do fragmento do músculo vasto lateral [Figura 7]. Vale ressaltar que as biópsias musculares foram realizadas em duplicata.



Figura 5. Assepsia da região da coxa (lado esquerdo da figura) e anestesia local com xilocaína a 2% sobre a região do vasto lateral (lado direito da figura).

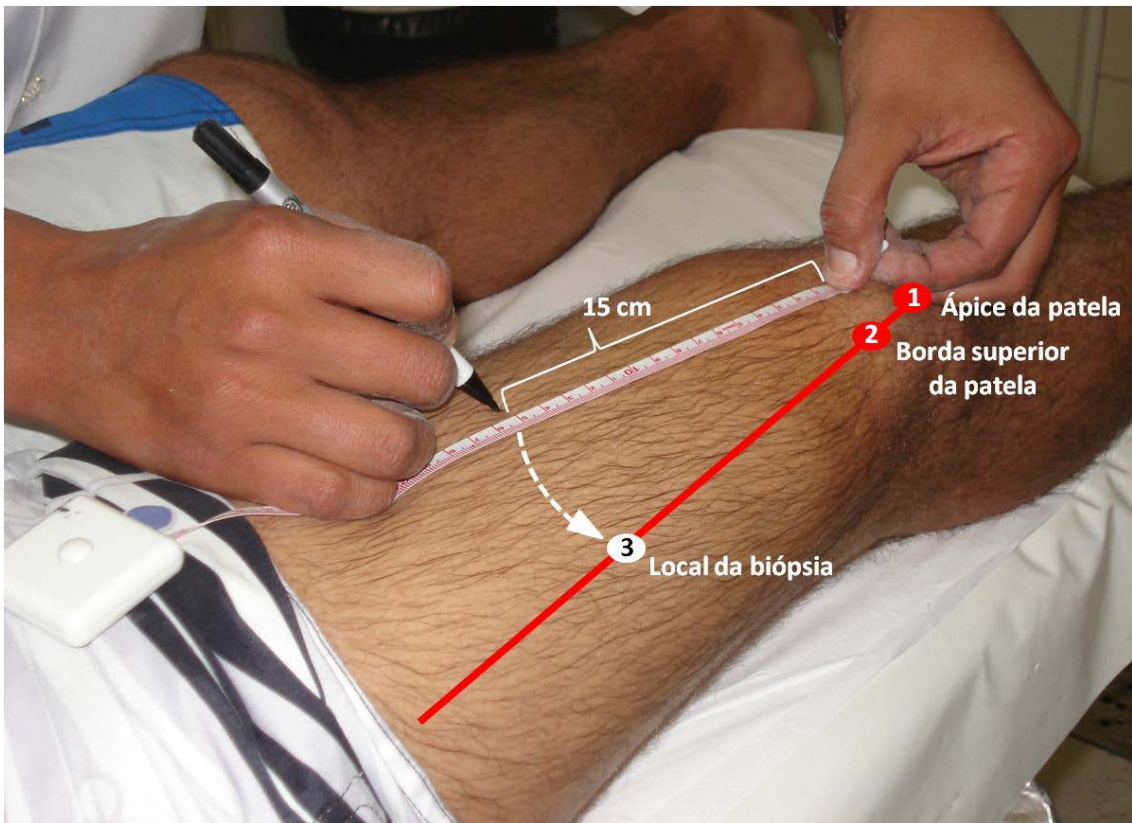


Figura 6. Local da biópsia do músculo vasto lateral, conforme seta e indicação de número 3.



Figura 7. Incisão realizada com lâmina de bisturi (lado esquerdo da figura) e introdução da agulha de biópsia no músculo vasto lateral (lado direito da figura).

Imediatamente após a retirada, o fragmento muscular foi depositado em criotubo livre de DNases e RNases, previamente mergulhado em nitrogênio líquido. A amostra contida no criotubo foi congelada em nitrogênio líquido [Figura 8] até o armazenamento em freezer -80 °C do laboratório de eletrotermofototerapia da UFSCar para posterior extração do RNA mensageiro (RNAm) que foi mantido em freezer -80 °C até a sua utilização. Por fim, a incisão foi ocluída com micropore [Figura 9] sem necessidade de sutura local (SCHILLING *et al.*, 2005). Os voluntários foram instruídos a não retirarem o curativo antes de 2 dias e também a não realizarem esforços intensos com o membro biopsiado. Este procedimento foi realizado pelo Médico Cirurgião – Ortopedista (colaborador do estudo).



Figura 8. Fragmento muscular (lado esquerdo da figura) e armazenamento em nitrogênio líquido (lado direito da figura).



Figura 9. Incisão da biópsia (lado esquerdo da figura) e oclusão com micropore (lado direito da figura).

Extração de RNA mensageiro (RNAm): A extração do RNAm das biópsias musculares utilizou o reagente TRIzol e seguiu a rotina dos laboratórios da Fundação Hemocentro e Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: 1) cada criotubo contendo o fragmento muscular foi pesado em balança de precisão; 2) o fragmento muscular foi colocado em outro recipiente e o criotubo inicial foi novamente pesado. Dessa maneira, foi calculada a diferença entre o peso inicial e final (peso do fragmento muscular); 3) foi calculada a quantidade de TRIzol e glicogênio para serem adicionados a cada fragmento muscular, respeitando a proporção de 10 mg de tecido/ 800 µl de TRIzol (Invitrogen) e 10 mg de tecido/ 10 µl de glicogênio (USB); 4) cada amostra (biópsia + TRIzol e glicogênio) foi macerada e homogeneizada por um homogeneizador (Fisher, modelo PowerGen 125, UK) e adicionando-se frações da quantidade de Trizol até a quantidade total; 5) a amostra foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e logo após foi armazenada em gelo seco; 6) cada amostra foi posteriormente incubada em temperatura ambiente por 5 minutos; 7) foi adicionado 200 µl de clorofórmio para cada ml de TRIzol e homogeneizado por 15 segundos em agitador vortex; 8) em seguida cada amostra foi

centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm e 4°C; 9) o sobrenadante (RNAm) foi transferido para outro tubo Eppendorf®; 10) foi adicionado 500 µl de isopropanol e a amostra foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos para se retirar o TRIzol; 11) a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos 4°C; 12) o sobrenadante foi desprezado; 12) o *pellet* (RNAm) foi lavado do fundo do Eppendorf® com etanol 70% na proporção de 1 ml/ ml de TRIzol utilizado na amostra; 13) o Eppendorf® foi invertido e o sobrenadante descartado; 14) o Eppendorf® foi seco em temperatura ambiente por 10 minutos de cabeça para baixo; 15) o RNAm foi dissolvido em água livre RNA (12 a 15 µl por Eppendorf®); 16) foi utilizada uma alíquota de 1 µl para se quantificar a concentração de RNAm por meio de espectrofotômetro (NanoVue – GE Healthcare, USA).

Expressão gênica por *microarrays*: Inicialmente foi realizado a purificação (*clean-up*) do RNAm das amostras utilizando RNeasy Mini Kit(50) Cat N° 74104 (QIAGEN) de acordo com o seu manual de instruções. Após esse processo, o RNAm total foi quantificado por espectrofotômetro. O volume total de RNAm para as reações de *microarray* foi de 5,3 µl para cada amostra, com concentrações variando de 2,7 a 12 µg/ µl. Também, por meio de eletroforese em gel de agarose, uma alíquota do RNAm das amostras foi investigada quanto a sua integridade (demonstrada pelas bandas 28S e 18S) [Figura 10], fotodocumentadas por câmara escura de mesa com transiluminador interno de luz ultravioleta (UV) acoplado à câmara fotográfica, conforme rotina dos laboratórios da Fundação Hemocentro e do Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (PANEPUCCI *et al.*, 2010). A figura 10 ilustra as amostras de RNAm de

8 dos 10 voluntários (4 do grupo GT e 4 do GTL) no momento pré e pós-treinamento, as quais foram utilizadas para os experimentos de *microarrays*.

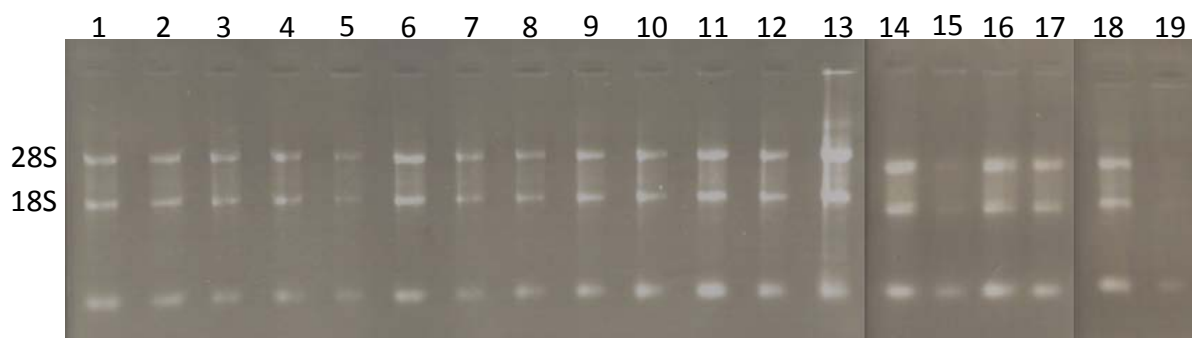


Figura 10. Investigação da integridade do RNA mensageiro (RNAm) em eletroforese em gel de agarose. Amostra 13 é foi controle; amostras 15 e 19 foram descartadas.

Uma vez purificada e analisada a integridade do RNAm, foi iniciado o protocolo para a análise de expressão gênica global por *microarrays*. Foi utilizada a plataforma Agilent *Whole Human Genome (4X44K) Oligo Microarray Kit* (Agilent, Santa Clara, CA, USA; G4112F) *one-color*, contendo 41.000 sondas para identificação de todos os genes humanos conhecidos, representados por oligonucleotídeos de 60 mer. Essa análise de expressão gênica foi realizada em cinco voluntários dos grupos GT e cinco do GTL escolhidos aleatoriamente. Utilizou-se o RNAm desses voluntários tanto do momento pré quanto do pós-treinamento. Essa análise foi dividida em etapas:

- 1) Preparação do controle *One-Color Spike-Mix* conforme manual do fabricante (Agilent). Foi adicionado 2 μ l de Agilent One-Color Spike-Mix para 38 μ l de Buffer de Diluição do kit (proporção de 1:20). Posteriormente foi retirado 2 μ l dessa primeira diluição e diluído em 48 μ l de Buffer de diluição (proporção de 1:25). Sequencialmente, 8 μ l da segunda diluição foi novamente diluído em 32 μ l (proporção de 1:5) desse mesmo Buffer. Finalmente, foi adicionado 5 μ l da

- terceira diluição ao RNAm (extraído das amostras de tecido muscular) o qual estava com volume igual a 5,3 µl e concentração superior a 1.000 ng/ µl;
- 2) Consistiu em sintetizar o DNA complementar (cDNA) ao RNAm. Foram adicionados 1,2 µl da enzima T7 Promoter Primer aos 5 µl do One-Color Spike Mix (terceira diluição) mais 5,3 µl de RNAm de cada amostra, totalizando um volume de 11,5 µl para cada amostra. Esse mix foi incubado por 10 minutos a 65°C e incubado em gelo por 5 minutos;
 - 3) Foi preparado o *cDNA Master Mix*, o qual foi composto por: 5X First Strand Buffer (4 µl/ reação); 0.1 M DTT (2 µl/ reação); 10mM dNTPmix (1 µl/ reação); MMLV-RT (1 µl/ reação) e RNaseOut (0,5 µl/ reação), totalizando 8,5 µl de *cDNA Master Mix* por reação (cada amostra). Em seguida, o *cDNA Master Mix* foi adicionado a cada amostra de RNAm da segunda etapa, incubado-se posteriormente por 2 horas a 40°C e a 65°C por mais 15 minutos. Por fim, o mix de RNAm e *cDNA Master Mix* foi incubado em gelo por 5 minutos.
 - 4) Sintetizar o RNA complementar (cRNA) a partir do cDNA previamente transcrito e marcá-lo. Preparou-se o *Transcription Master Mix*, composto por água livre de nucleases (15,3 µl/ reação); 4X Transcription Buffer (20 µl/ reação); 0.1 M DTT (6 µl/ reação); NTP mix (8 µl/ reação); 50% PEG (6,4 µl/ reação); RNaseOut (0,5 µl/ reação); Pirofosfatase inorgânica (0,6 µl/ reação); T7 RNA Polimerase (0,8 µl/ reação) e Cyanine 3-CTP para a marcação do cRNA (2,4 µl/ reação). Foi adicionado 60 µl do *Transcription Master Mix* a cada amostra da reação final da terceira etapa e incubada a 40°C por 2 horas. Nesse passo, cada amostra totalizou o volume de 80 µl;
 - 5) Foi realizada a purificação do cRNA amplificado e marcado usando RNeasy Mini Kit(50) Cat N° 74104 (QIAGEN). Nessa etapa, foram adicionados: 20 µl

de água livre de nucleases; 350 µl de Buffer RLT e 250 µl de etanol a 96%. Em seguida, foram transferidos 700 µl desse mix para um RNeasy mini column dentro de um tubo coletor de 2 ml. Centrifugou-se por 30 segundos, a 13.000 rotações por minuto (rpm) e 4°C. O RNeasy mini column foi transferido para outro tubo coletor e adicionou-se 500 µl de Buffer RPE (contendo etanol). Foi novamente centrifugado a 13.000 rpm e a 4°C (duas vezes). O RNeasy mini column foi transferido para outro tubo coletor, agora com 1,5 ml. Foram adicionados 30 µl de água livre de RNase diretamente sobre a membrana do RNeasy mini column e após 5 minutos, foi centrifugado por 1 minuto e 30 segundos a 13.000 rpm. O RNeasy mini column foi descartado e o RNA marcado e purificado foi incubado em gelo;

6) Foi realizada a quantificação do cRNA marcado e atividade da Cyanine. O cRNA total de cada amostra foi quantificado espectrofotometricamente por (NanoVue – GE Healthcare, USA), utilizando-se a razão 260/280, dado em ng/µl. A quantificação da Cyanine foi da mesma maneira, porém em pmol/µl. A concentração de cRNA marcado e a concentração de Cyanine foram calculados a partir das fórmulas contidas no manual do fabricante (Agilent): $[\text{cRNA}] * 30\mu\text{l} / 1.000 = \mu\text{g de cRNA}$; $[\text{Cyanine}] / [\text{cRNA}] * 1.000 = \text{pmol de Cyanine por } \mu\text{g de cRNA}$. Nessa etapa, todas as amostras continham concentrações acima dos níveis críticos considerados para hibridação, os quais são: $[\text{cRNA}] < 1,65 \mu\text{g}$ e $[\text{Cyanine}] < 9,0 \text{ pmol}$;

7) Para a hibridação, primeiramente foi preparado a solução “10X Blocking Agent”, a qual consistiu de 10X Blocking Agent mais 500 µl de água livre de nuclease. Posteriormente, ao volume/ massa de 1,65 µg de cRNA marcado e quantificado, foram adicionados: 11 µl de 10X Blocking Agent; 52,8 µl de água

livre de nuclease e 2,2 μ l de 25X Fragmentation Buffer, com o volume total de 55 μ l. Em seguida foi incubado a 60°C por 30 minutos para fragmentação do cRNA. Após fragmentação, foram adicionados 55 μ l do buffer 2X GEx Hybridization HI-RPM à amostra e, dos 110 μ l finais da solução de hibridação, 100 μ l foram utilizados conforme recomendado pelo fabricante (Agilent). Para hibridar o cRNA marcado ao chip de *microarray*, utilizou-se Gasket (Agilent, G2534A) e câmara de hibridação SureHyb (Agilent, G2534A), por 17 horas (*overnight*), a 65°C e a 4 rpm em forno de hibridação (Agilent, G2545A) [Figura 11]. A disposição das amostras nas hibridações está representada na figura 12.



Figura 11. Gasket e câmaras de hibridação Agilent (lado esquerdo da figura) e forno de hibridação Agilent (lado direito da figura).

Arrays				
	Array 1_1	Array 1_2	Array 1_3	Array 1_4
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	GT 1 pré	GT1 pós	GTL 1 pré	GTL 1 pós
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	GT 2 pré	GT2 pós	GTL 2 pré	GTL 2 pós
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	GT 3 pré	GT 3 pós	GTL 3 pré	GTL 3 pós
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	GT 4 pré	GT 4 pós	GTL 4 pré	GTL 4 pós
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	GT 5 pré	GT 5 pós	GTL 5 pré	GTL 5 pós

Figura 12: Distribuição das amostras dos grupos GT e GTL para a hibridação com os chips de *microarrays*.

- 8) Após hibridação, os chips de *microarrays* foram lavados, secos, escaneados e os dados extraídos utilizando o software *Agilent Feature Extraction* (version 8.5). A figura 13 mostra um exemplo de chip de *microarray* escaneado após hibridação. É importante destacar que cada ponto verde da figura 13 possui coordenadas *X* e *Y* para a identificação de cada sonda (gene), configurando-se

em um mapa. A figura 14 ilustra didaticamente como ocorre a hibridação da amostra de interesse ao chip de *microarray*. Também, os valores de expressão dos genes são proporcionais à intensidade do brilho do fluoróforo utilizado, que nesse estudo foi o Cy3 (green). O relatório gerado pelo software *Agilent Feature Extraction* revelou que as hibridizações foram realizadas com sucesso, pois o coeficiente de variação mediano obtido a partir dos sinais de fluorescência dos diferentes controles (“Spike In” – a partir do uso do kit “One Color RNA Spike-In Kit”) foi adequado para todas as hibridizações. A figura 15 ilustra graficamente o coeficiente de variação dos sinais de fluorescência obtidos para os diferentes controles (esquerda) e a relação linear entre o sinal obtido e a concentração dos Spikes (direita). Resultados representativos do experimento de *microarray* da amostra GT1 pré.

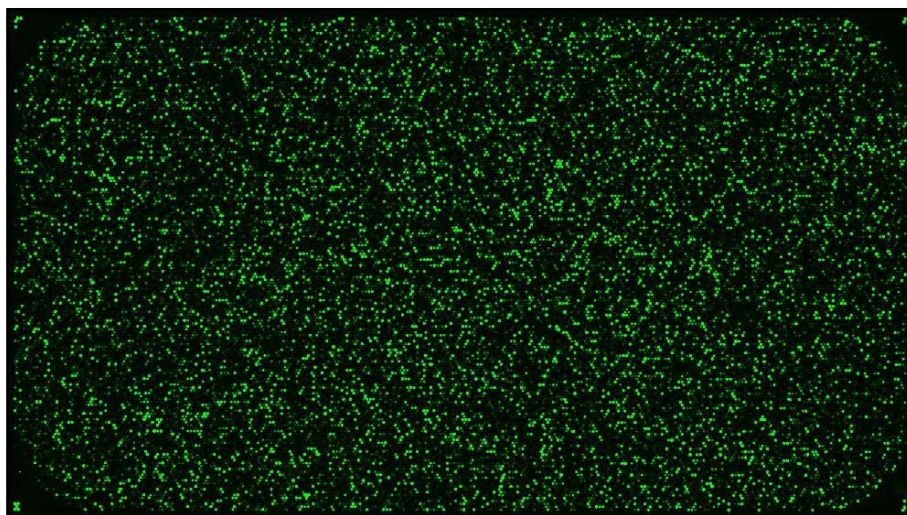


Figura 13: Chip de *microarray* escaneado após hibridação.

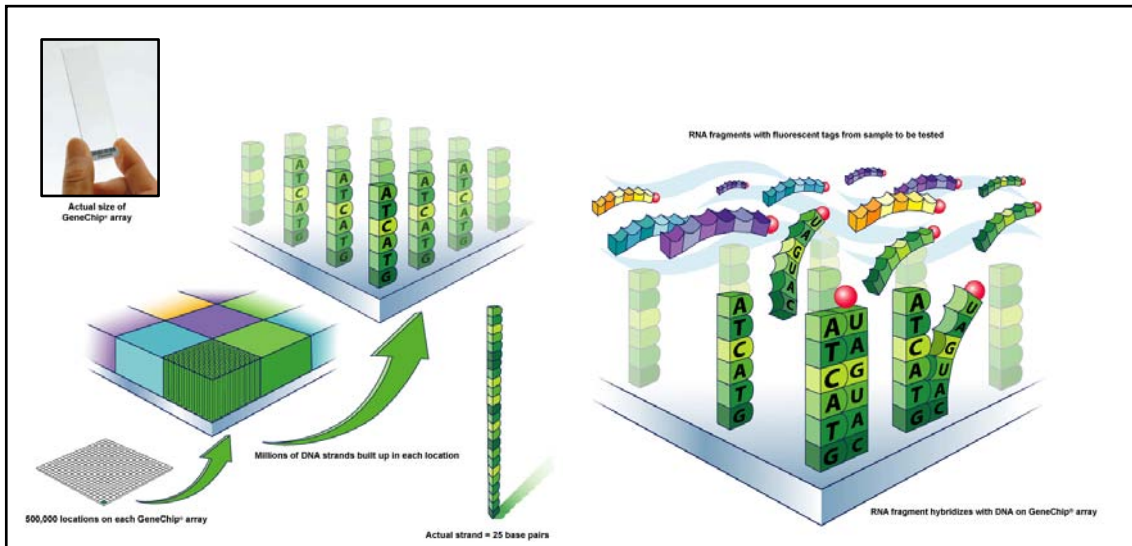


Figura 14: Chip de *microarray* e suas sondas para hibridação com a amostra investigada.

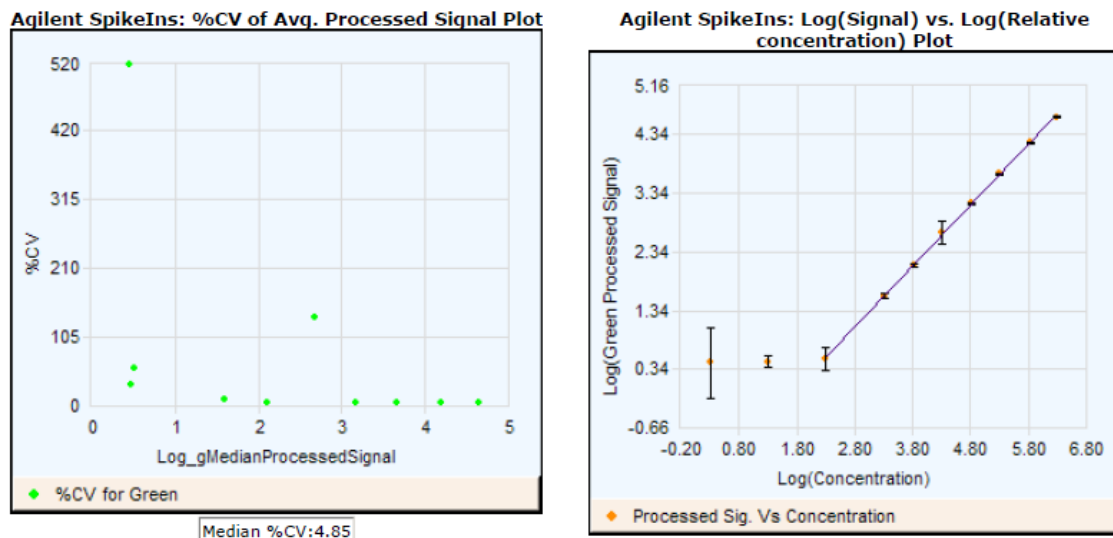


Figura 15. Indicadores de qualidade das hibridações: gráfico do coeficiente de variação dos sinais de fluorescência obtidos para os diferentes controles (esquerda) e a relação linear entre o sinal obtido e a concentração dos Spikes (direita) do experimento de *microarray* da amostra GT1 pré.

9) Foi realizada a extração dos dados de expressão gênica dos chips de *microarrays* e exportados em formato de planilhas do Microsoft Excel, as quais contêm mais de 43.000 linhas e 20 colunas, descrevendo informações sobre número, nome, descrição do gene e seu valor de expressão. Também, o nome e número de cada sonda de identificação do gene, sequencia de nucleotídeos das sondas e localização de cada sonda nos chips de *microarrays* de todos os 10 voluntários (5 do grupo GT e 5 do grupo GTL), tanto no momento pré, quanto no momento pós-treinamento físico.

Análise estatística

Foi analisada a normalidade da distribuição dos dados pelo teste de Shapiro Wilk's W e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. O efeito do treinamento sobre a 1RM, desempenho muscular em dinamometria isocinética e a perimetria da coxa foram verificados por meio da análise de variâncias (ANOVA) de duas vias (*two-way*) com medidas repetidas. Os fatores independentes foram o grupo (com 3 níveis – GTL, GT e GC) e o tempo (com 2 níveis – inicial e final), o qual também foi considerado como medida repetida. Quando encontradas diferenças significativas, realizamos o teste de *post hoc* de Tukey HSD. Os efeitos do treinamento foram analisados pela variação percentual em relação à linha de base (considerada 100%) e comparado entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (três grupos: GLT *versus* GT *versus* GC). O nível de significância foi de $P < 0,05$.

A análise estatística dos dados de expressão gênica pré e pós-treinamento por *microarrays* foi conduzida utilizando teste t pareado para os grupos GT e GTL, bem

como entre os grupos (GT *versus* GTL) por meio de teste t não pareado considerando os dados de expressão do pós-treinamento desses grupos.

Após o processo de hibridação das amostras com os chips de *microarrays*, escaneamento e extração dos dados de expressão com o software “Agilent Feature Extraction” (version 8.5), foram iniciadas a triagem e as análises estatísticas para identificarmos quais transcritos foram modulados significativamente ($P < 0,05$) pelo treinamento físico de força associado ou não à laserterapia de baixa intensidade (LLLT). O primeiro passo foi a normalização da intensidade dos valores de expressão obtidos nos *microarrays* através da utilização da mediana desses valores. As figuras 16, 17 e 18 representam os dados normalizados.

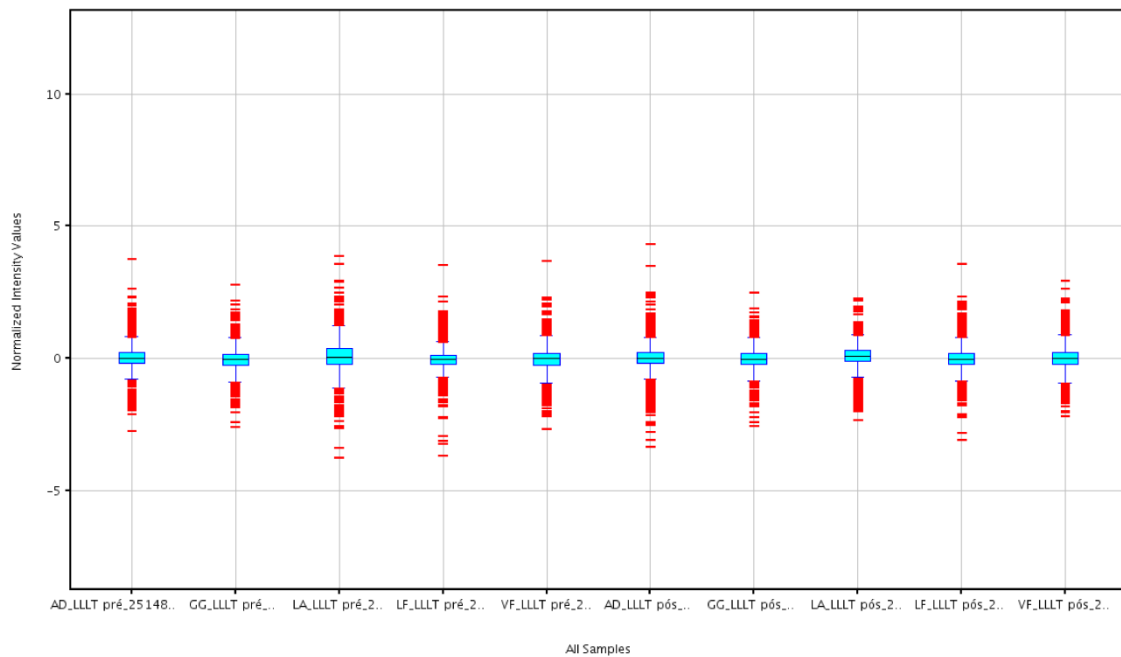


Figura 16: Normalização da intensidade dos valores de expressão através da mediana. Análise pareada para o grupo GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

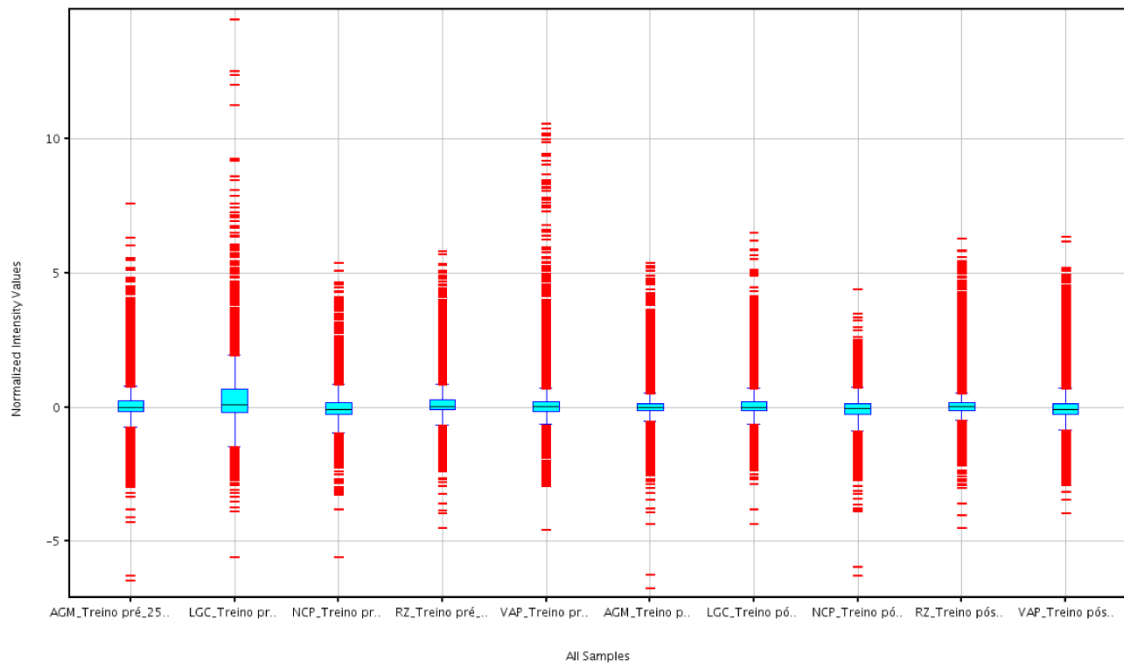


Figura 17: Normalização da intensidade dos valores de expressão através da mediana. Análise pareada para o grupo GT (grupo treinamento).

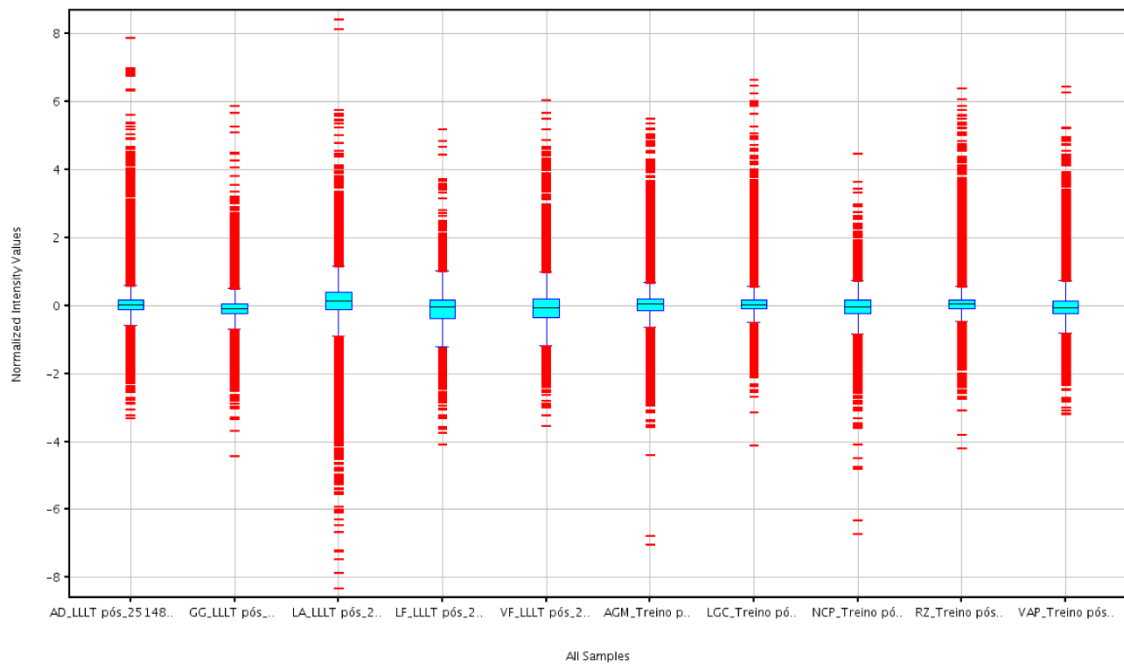


Figura 18: Normalização da intensidade dos valores de expressão através da mediana. Análise não-pareada entre os grupos GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade) e GT (grupo treinamento) na condição pós-treinamento.

Após a normalização da intensidade dos valores de expressão, conduzimos outras duas filtragens dos dados para retirar das análises estatísticas as cópias ou replicatas das sondas que são normalmente impressas nos chips de *microarrays*, bem como sondas não detectadas e/ou com erros, permitindo, assim, apenas um valor por gene a ser considerado nas análises estatísticas. Esses filtros excluem as sondas comprometidas e não detectadas, além de fazer uma média aritmética das intensidades das demais sondas detectadas para o mesmo gene.

RESULTADOS

Dados antropométricos

Os dados antropométricos dos voluntários, incluindo idade, massa corporal, altura e perimetria da coxa pré e pós-treinamento são mostrados nas tabelas 1 e 2.

Grupos	Pré-treinamento				
	Idade	MC	Altura	IMC	PD
GC	21,80±2,61	77,10±13,50	1,80±0,05	23,47±3,83	56,95±5,67
GT	21,20±2,57	75,70±6,39	1,78±0,05	23,79±1,92	56,25±3,79
GTL	19,70±0,82	76,60±11,50	1,78±0,06	24,00±2,15	56,25±4,20

Tabela 1: Valores das médias ± desvio-padrão da caracterização antropométrica dos voluntários de cada grupo no momento pré-treinamento físico. Idade (anos); MC= massa corporal (Kg); altura (metros); IMC=índice de massa corpórea (Kg/m²); PD= perimetria da coxa do membro inferior dominante (centímetros). Grupos: GC (grupo controle), GT (grupo treinamento), GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

Grupos	Pós-treinamento				
	Idade	MC	Altura	IMC	PD
GC	21,80±2,61	77,20±13,33	1,80±0,05	23,47±3,85	56,90±5,61
GT	21,20±2,57	76,84±7,39	1,78±0,05	24,48±1,90	57,80±3,50
GTL	19,70±0,82	77,60±12,12	1,78±0,06	24,29±2,30	58,80±4,73

Tabela 2: Valores das médias \pm desvio-padrão da caracterização antropométrica dos voluntários de cada grupo no momento pós-treinamento. Idade (anos); MC= massa corporal (Kg); altura (metros); IMC=índice de massa corpórea (Kg/m^2); PD= perimetria da coxa do membro inferior dominante (centímetros). Grupos: GC (grupo controle), GT (grupo treinamento), GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

Não houve diferenças significativas para o aumento ou diminuição de massa corporal e IMC entre os grupos ($P > 0,05$). A perimetria da coxa dos voluntários do grupo GT após o treinamento foi maior ($P < 0,001$), assim como o grupo GTL também aumentou a perimetria da coxa ($P < 0,001$), enquanto o grupo GC não aumentou ($P > 0,05$) nas análises de variância (ANOVA). Na análise de Kruskal-Wallis, o aumento de 2,8% na perimetria da coxa do grupo GT foi maior que a diminuição de 0,08% do grupo GC ($P = 0,004$). O aumento de 4,6% na perimetria da coxa dos voluntários do grupo GTL foi maior que a diminuição de 0,08% do grupo GC ($P < 0,001$). Entre os grupos GT e GTL não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

Dinamometria isocinética (Biodex) e teste de 1 repetição máxima em *leg press* (1RM):

O desempenho muscular em dinamômetro isocinético e teste de 1RM em *leg press* nos momentos pré e pós-treinamento de todos os grupos do estudo (GT, GTL, GC) estão apresentados nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Grupos	Pré-treinamento			
	MPT	PT	POT	TRAB
GC	227,08±29,71	245,95±26,67	151,44±17,41	962,36±126,50
GT	225,63±22,37	242,73±17,27	154,82±15,96	965,66±83,29
GTL	218,03±38,40	234,72±36,57	149,96±23,80	947,96±168,38

Tabela 3: Valores das médias \pm desvio-padrão da Média dos Picos de Torque (MPT) expresso em N-m (Newton-metro); Pico de Torque (PT) expresso em N-m (Newton-metro); Potência (POT) expressa em W (Watt) e Trabalho (TRAB) expresso em J (Joule) dos músculos extensores do joelho na avaliação do desempenho muscular em dinamometria isocinética (BIODEX) no momento pré-treinamento físico. Grupos: GC (grupo controle), GT (grupo treinamento), GTL (grupo treinamento + laserterapia de baixa intensidade).

Grupos	Pós-treinamento			
	MPT	PT	POT	TRAB
GC	220,86±25,06	238,89±24,99	152,34±12,64	961,77±102,83
GT	235,66±25,70	250,61±26,01	164,49±12,96	1.028,82±123,66
GTL	236,38±39,46	248,72±41,01	169,14±28,64	1.044,83±173,00

Tabela 4: Valores das médias \pm desvio-padrão da Média dos Picos de Torque (MPT) expresso em N-m (Newton-metro); Pico de Torque (PT) expresso em N-m (Newton-metro); Potência (POT) expressa em W (Watt) e Trabalho (TRAB) expresso em J (Joule) dos músculos extensores do joelho na avaliação do desempenho muscular em dinamometria isocinética (BIODEX) no momento pós-treinamento. Grupos: GC (grupo controle), GT (grupo treinamento), GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

Grupos	1RM <i>leg press</i>	
	Pré-treinamento	Pós-treinamento
GC	347,00±64,29	349,00±65,05
GT	387,90±65,23	500,50±88,48
GTL	352,50±49,33	552,10±67,90

Tabela 5: Valores das médias \pm desvio-padrão da carga do teste de 1RM em *leg press* expressos em quilograma (Kg). Valores para os momentos pré, pós-treinamento. Grupos: GC (grupo controle), GT (grupo treinamento), GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

Variável	Ganho e perda (%) após treinamento			ANOVA (pré x pós-treinamento) (<i>P</i> valor)			Kruskal-Wallis (<i>P</i> valor)		
	GTL	GT	GC	GTL	GT	GC	GTL x GC	GTL x GT	GT x GC
1RM <i>leg press</i>	57,71	29,08	0,66	<i>P</i> <0,001*	<i>P</i> <0,001*	<i>P</i> =0,099	<i>P</i> <0,001*	<i>P</i> =0,033*	<i>P</i> =0,033*
MPT	8,89	4,49	-2,50	<i>P</i> <0,001*	<i>P</i> =0,118	<i>P</i> =0,577	<i>P</i> =0,001*	<i>P</i> =0,965	<i>P</i> =0,044*
PT	5,97	3,13	-2,76	<i>P</i> =0,014*	<i>P</i> =0,357	<i>P</i> =0,476	<i>P</i> <0,001*	<i>P</i> =0,612	<i>P</i> =0,047*
POT	12,91	6,75	1,07	<i>P</i> <0,001*	<i>P</i> =0,070	<i>P</i> =0,999	<i>P</i> =0,002*	<i>P</i> =0,401	<i>P</i> =0,213
TRAB	10,70	6,52	0,38	<i>P</i> =0,001*	<i>P</i> =0,075	<i>P</i> =1,000	<i>P</i> =0,011*	<i>P</i> =0,759	<i>P</i> =0,239

Tabela 6. Grupos: GC (grupo controle), GT (grupo treinamento), GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade). Siglas: massa corporal (MC); massa magra (MM); perimetria da coxa do membro inferior dominante (PD); Média dos Picos de Torque (MPT), Pico de Torque extensor (PT), Potência (POT) e Trabalho (TRAB) dos músculos extensores do joelho. *: significância estatística.

Análise de expressão gênica por *microarrays*:

Considerando o grupo GTL, abaixo segue a figura 19 que representa a tabela exportada do software *Genespring*, a qual traz um sumário dos genes diferencialmente expressos e classificados por magnitude de mudança (*fold change* – FC) e também pelo valor de *P*. É importante notar que o número de genes considerados nas análises foi de 29.665, e não os 41.000 genes impressos nos chips de *microarrays*.

Test Description						
Selected Test : T Test paired						
p-value computation: Asymptotic						
Multiple Testing Correction: No Correction						
Result Summary						
	P all	P < 0.05	P < 0.02	P < 0.01	P < 0.0050	P < 0.0010
FC all	29665	2242	1027	604	333	85
FC > 1.1	15536	2118	993	586	325	83
FC > 1.5	2113	485	251	157	81	25
FC > 2.0	389	106	61	41	21	8
FC > 3.0	49	21	18	11	6	1
Expected by c...		1483	593	296	148	29

Figura 19: Sumário do número de genes diferencialmente expressos e classificados de acordo com a sua magnitude de mudança (*fold change* – FC) e valor de *P* para o grupo GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

A figura 20 representa a distribuição dos genes diferencialmente expressos (em vermelho) de acordo com a sua magnitude de mudança (*fold change* - FC). A parte A da figura 20 representa um FC de 1,0; a parte B um FC de 1,5; a parte C um FC de 2,0; a parte D um FC de 3,0 e a parte E representa um FC de 4,0. É importante notar que a grande maioria dos genes diferencialmente expressos foi modulada na ordem de 1 a 2 vezes referente à condição pré-treinamento.

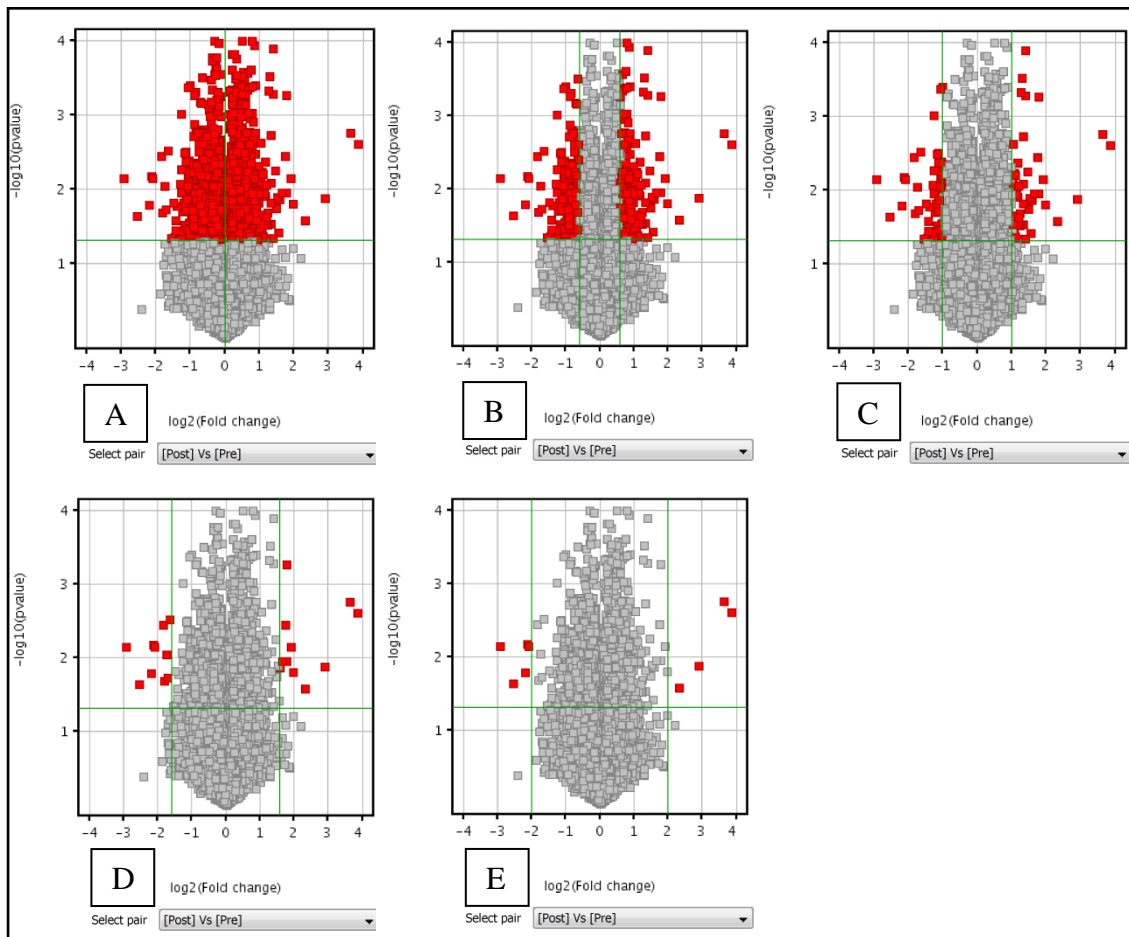


Figura 20: Distribuição dos genes diferencialmente expressos no grupo GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade) de acordo com a magnitude de mudança (*fold change* – FC). A= FC de 1,0; B= FC de 1,5; C= FC de 2,0; D= FC de 3,0; E= FC de 4,0.

Da mesma maneira que foi conduzida a análise estatística para o grupo GTL, conduzimos as análises para o grupo GT. A figura 21 representa uma tabela resumindo os genes diferencialmente expressos e classificados por magnitude de mudança (*fold change* – FC) e também pelo valor de *P* para o grupo GT. É importante notar que o número de genes considerados nas análises foi de 29.784, e não os 41.000 genes impressos nos chips de *microarrays*.

Test Description						
Selected Test : T Test paired						
p-value computation: Asymptotic						
Multiple Testing Correction: No Correction						
Result Summary						
	P all	P < 0.05	P < 0.02	P < 0.01	P < 0.0050	P < 0.0010
FC all	29784	1793	663	317	154	26
FC > 1.1	17885	1692	627	296	144	25
FC > 1.5	2160	410	176	85	44	5
FC > 2.0	493	103	52	29	14	2
FC > 3.0	75	17	13	9	5	2
Expected by c...		1489	595	297	148	29

Figura 21: Sumário do número de genes diferencialmente expressos e classificados de acordo com a sua magnitude de mudança (*fold change* – FC) e valor de *P* e para o grupo GT (grupo treinamento).

A figura 22 representa a distribuição dos genes diferencialmente expressos (em vermelho) de acordo com a sua magnitude de mudança (*fold change* - FC) do grupo GT. A parte *A* da figura representa um FC de 1,0; a parte *B* um FC de 1,5; a parte *C* um FC de 2,0; a parte *D* um FC de 3,0 e a parte *E* da figura representa um FC de 4,0. É importante notar que a grande maioria dos genes diferencialmente expressos também foi modulada na ordem de 1 a 2 vezes referente à condição pré-treinamento.

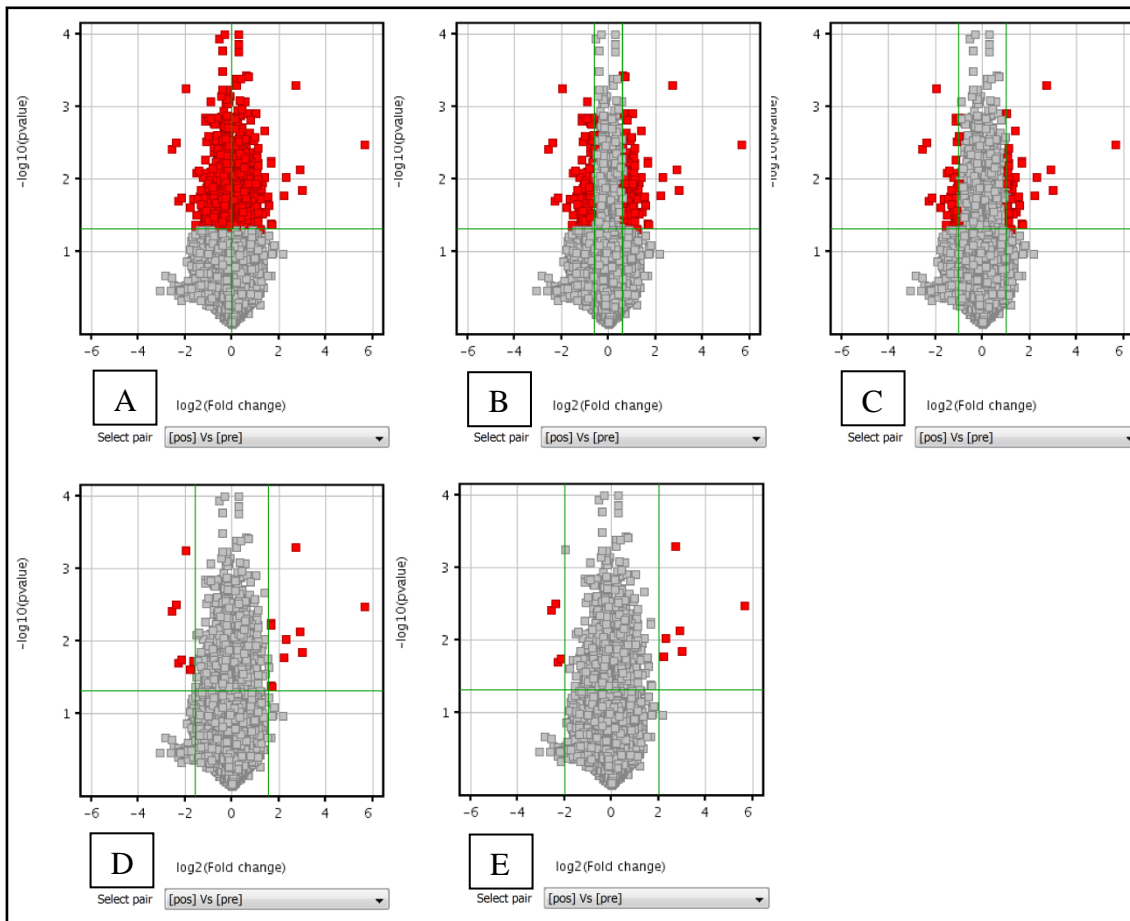


Figura 22: Distribuição dos genes diferencialmente expressos no grupo GT (grupo treinamento) de acordo com a magnitude de mudança (*fold change* – FC). A= FC de 1,0; B= FC de 1,5; C= FC de 2,0; D= FC de 3,0; E= FC de 4,0.

Comparamos os grupos GTL e GT na condição pós-treinamento por meio de teste t não pareado, conforme descrito anteriormente. A figura 23 traz o sumário dos genes diferencialmente expressos e classificados por magnitude de mudança (*fold change* – FC) e também pelo valor de *P*. É importante notar que o número de genes considerados nas análises foi de 29.784, e não os 41.000 genes impressos nos chips de *microarrays*.

Test Description						
Selected Test : T Test unpaired						
p-value computation: Asymptotic						
Multiple Testing Correction: No Correction						
Result Summary						
	P all	P < 0.05	P < 0.02	P < 0.01	P < 0.0050	P < 0.0010
FC all	29784	1485	497	213	99	18
FC > 1.1	18022	1474	494	211	99	18
FC > 1.5	3011	655	234	104	53	10
FC > 2.0	617	163	65	43	26	5
FC > 3.0	68	25	11	6	4	0
Expected by ...		1489	595	297	148	29

Figura 23: Sumário do número de genes diferencialmente expressos e classificados de acordo com a sua magnitude de mudança (*fold change* – FC) e valor de *P* entre os grupos GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade) e grupo GT (grupo treinamento) pós-treinamento.

A figura 24 representa a distribuição dos genes diferencialmente expressos (em vermelho) de acordo com a sua magnitude de mudança (*fold change* - FC). A parte *A* da figura representa um FC de 1,0; a parte *B* um FC de 1,5; a parte *C* um FC de 2,0; a parte *D* um FC de 3,0 e a parte *E* da figura representa um FC de 4,0. É importante notar que a grande maioria dos genes diferencialmente expressos também foi modulada na ordem de 1 a 2 vezes referente à condição pré-treinamento.

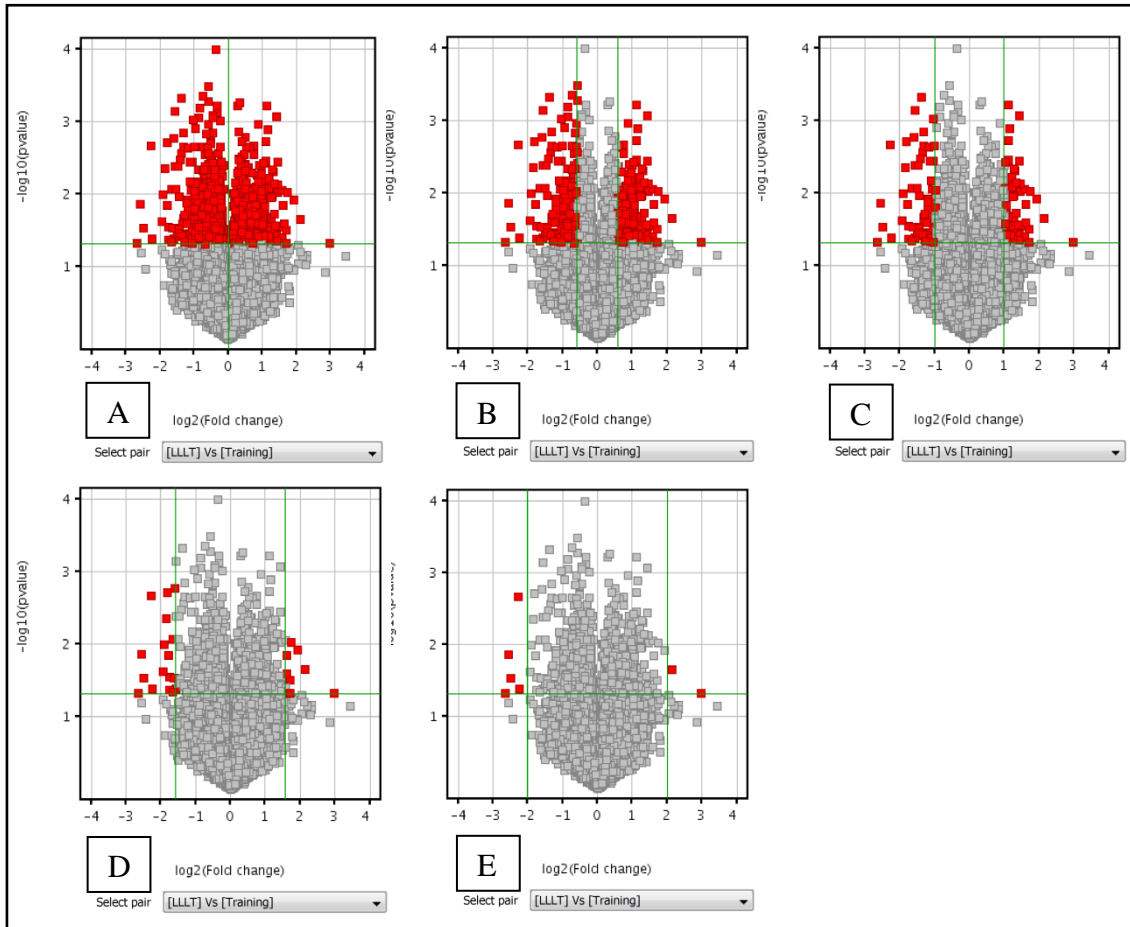


Figura 24: Distribuição dos genes diferencialmente expressos entre os grupos GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade) de acordo com a magnitude de mudança (*fold change* – FC) pós-treinamento. A= FC de 1,0; B= FC de 1,5; C= FC de 2,0; D= FC de 3,0; E= FC de 4,0.

Um detalhe de extrema importância referente à quantidade de genes diferencialmente expressos para todas as análises realizadas no software *Genespring* é que muitas sondas identificadas com valores significativos de expressão não codificam gene algum (sondas de controle dos *microarrays*) ou são sondas de genes com função desconhecida. Dessa maneira, foi realizada uma filtragem manual adicional dessas sondas, utilizando o mapa das sondas dos chips de *microarrays* (Agilent) como padrão, excluindo as sondas desconhecidas e de controle. Assim, o número total de genes que

foi significativamente expresso no grupo GTL foi de **1.985** e não **2.242**; no grupo GT foi **1.539** e não **1.793**, e nas comparações não pareadas entre os grupos foi de **1.185** e não **1.485**.

Por fim, analisamos as duas listas (tabelas) de genes diferencialmente expressos referente aos grupos GTL e GT a fim de identificarmos genes diferencialmente expressos de forma concomitante nesses dois grupos. Assim, fizemos uma análise de intersecção entre os transcritos significativamente expressos nos grupos GTL e GT, a qual identificou 328 genes. A figura 25 é um *Diagrama de Venn* que representa essa análise de intersecção.

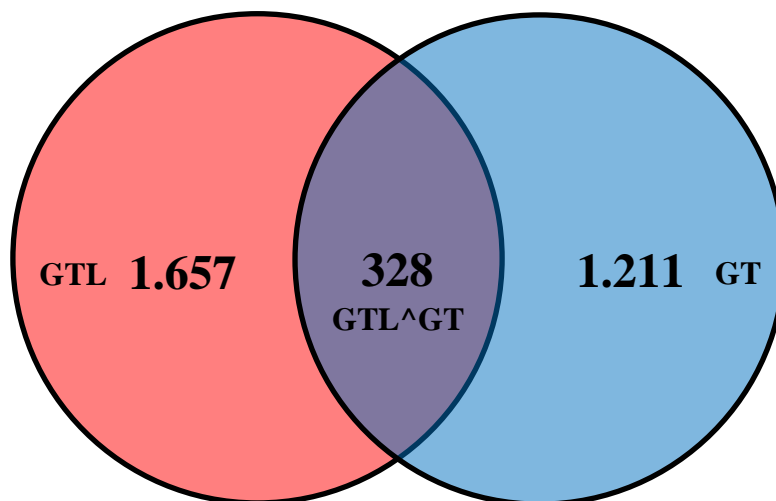


Figura 25: Diagrama de Venn ilustrando a análise de intersecção dos genes significativamente expressos em ambos os grupos (GTL e GT). GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

Após as análises estatísticas dos genes diferencialmente expressos nos *microarrays*, identificamos e avaliamos os genes candidatos a endógenos (*housekeeping*) por meio do software geNorm e seguindo a literatura científica (DE JONGE *et al.*, 2007).

A identificação dos melhores genes endógenos é de fundamental importância para a posterior validação, por meio de RT-PCR, dos resultados obtidos nas análises estatísticas dos *microarrays*. Na literatura científica os genes mais utilizados são, sem dúvida, os genes GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e ACTB (actin, beta) (DE JONGE *et al.*, 2007). No entanto, tivemos o cuidado de checar se realmente esses genes candidatos a endógenos (*housekeeping*) são realmente estáveis entre os grupos e condições (pré e pós-treinamento) do presente estudo, pois o próprio treinamento físico associado ou não à laserterapia de baixa intensidade (LLLT) promove adaptações estruturais nas fibras musculares, como incremento de proteínas contráteis. Além desse viés, é sabido que a LLLT pode alterar o metabolismo celular de forma significativa (ZHANG *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2009; PELOW e BAXTER, 2013) e, por conseguinte, talvez interferir na expressão do gene GAPDH que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, importante para o metabolismo dos carboidratos. Também, é sabido que o metabolismo energético anaeróbio láctico (glicolítico e com produção de ácido láctico) é o metabolismo predominante no fornecimento de energia durante o treinamento físico de força empregado nesse estudo. Dessa maneira, buscamos outros genes candidatos a genes endógenos baseando-se nos dados de expressão dos *microarrays* de ambos os grupos (GT e GTL) que não foram significativamente modulados e que são referências na literatura científica (DE JONGE *et al.*, 2007), conforme tabela 7 abaixo:

Símbolo do Gene	Nome oficial do Gene
HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
OAZ1	<i>ornithine decarboxylase antizyme 1</i>
ERCC6	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6</i>
COVA1 atualizado para ENOX2	<i>ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2</i>
PRDM4	<i>PR domain containing 4</i>
RPS13	<i>ribosomal protein S13</i>
RPL27	<i>ribosomal protein L27</i>
RPS20	<i>ribosomal protein S20</i>
RPS29	<i>ribosomal protein S29</i>
RPL24	<i>ribosomal protein L24</i>

Tabela 7: Genes candidatos a endógenos (*housekeeping*) nos experimentos de *microarrays*.

O resultado da análise da estabilidade dos genes por meio do software geNorm está apresentado na figura 26 abaixo:

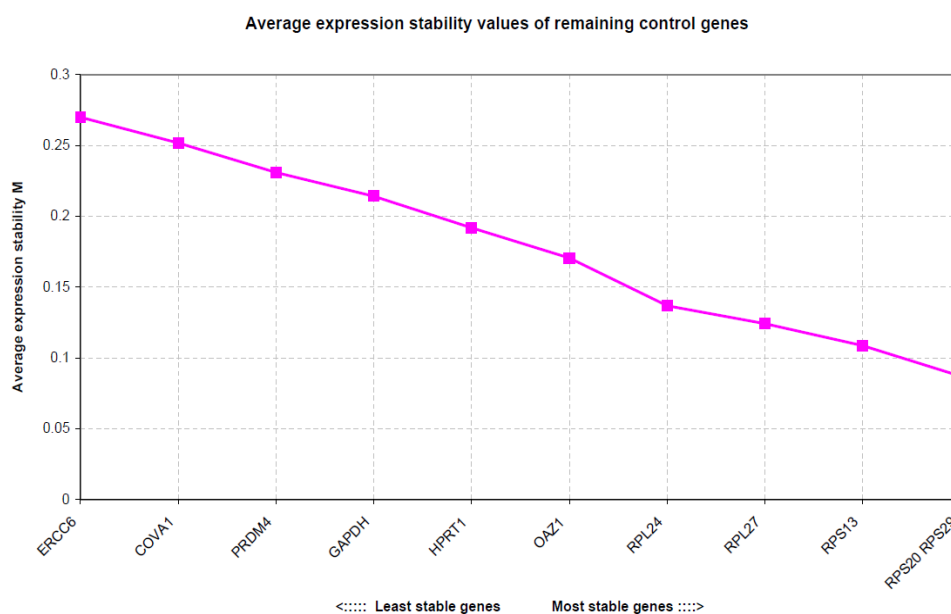


Figura 26: Análise da estabilidade ou menor variação de expressão dos genes candidatos a endógenos para os experimentos de *microarrays* para ambos os grupos do estudo: GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

Após verificarmos que os genes mais estáveis e possíveis candidatos a endógenos nos experimentos de *microarrays* foram os genes RPS20, RPS29, RPS13 e RPL27, sintetizamos pares de iniciadores (*primers*) para testar a sua estabilidade em RT-PCR. Também, optamos por sintetizar e testar *primers* para os genes HPRT1 e GAPDH. O desenho dos *primers* desses genes segue na tabela 8 abaixo:

NM (Gene)	Gene-Primer	Sequência
NM_001023 (RPS20)	RPS20_RT_F	5' TGCTGACTTGATAAGAGGCG 3'
	RPS20_RT_R	5' GATCCCACGTCTTAGAACCTTC 3'
NM_001032 (RPS29)	RPS29_RT_F	5' GCACTGCTGAGAGCAAGATG 3'
	RPS29_RT_R	5' ATAGGCAGTGCCAAGGAAGA 3'
NM_001017 (RPS13)	RPS13_RT_F	5' TCTCCTTTCGTTGCCTGATC 3'
	RPS13_RT_R	5' AATCTGCTCCTTCACGTCG 3'
NM_000988 (RPL27)	RPL27_RT_F	5' ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA 3'
	RPL27_RT_R	5' TCTGAAGACATCCTTATTGACG 3'
NM_002046 (GAPDH)	GAPDH_RT_F	5' ACATCGCTCAGACACCATG 3'
	GAPDH_RT_R	5' TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG 3'
NM_000194 (HPRT1)	HPRT1_RT_F	5' TGCTGAGGATTTGGAAAGGG 3'
	HPRT1_RT_R	5' ACAGAGGGCTACAATGTGATG 3'

Tabela 8. Desenho dos pares de *primers* para avaliação de genes endógenos.

Uma vez sintetizado os pares de *primers*, iniciamos a transcrição reversa do RNA mensageiro das amostras de todos os voluntários que participaram das análises de *microarrays*, bem como dos demais voluntários. Para a transcrição reversa do RNA mensageiro (síntese de cDNA), utilizamos o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) seguindo seu manual de instruções e ciclo em

termociclador de 25°C (10 minutos), seguido de 37°C (120 minutos) e 4°C (infinito – armazenamento).

Depois de sintetizado o cDNA de todas as amostras, as reações em RT-PCR utilizaram o Kit GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega) seguindo também seu manual de instruções, incluindo o reagente *CXR Reference Dye* no preparo do Mix de Reação na proporção de 0,5 µl para 50 µl de reação. O ciclo utilizado foi de 50°C (1x2 minutos), 95°C (1x10 minutos), 95°C (40x15 segundos), 60°C (40x1 minuto), 95°C (1x 15 segundos), 60°C (1x30 segundos), 95°C (1x15 segundos).

Nas análises de RT-PCR dos genes candidatos a endógenos (*housekeeping*) de todas as amostras dos voluntários (pré e pós-treinamento), foram obtidos os valores dos *cycle thresholds* (CTs). A partir desses valores, uma nova análise da estabilidade dos genes candidatos a endógenos foi realizada utilizando-se o software geNorm. O resultado dessa análise [Figura 27] está de acordo com a análise prévia realizada a partir dos valores de expressão gênica dos *microarrays* [Figura 26], evidenciando que o gene RPS20 é o mais estável (com menor variação de expressão) e o gene GAPDH não é um bom gene endógeno para esse estudo. Dessa maneira, para todas as análises de validação dos experimentos de *microarrays* utilizamos o gene endógeno RPS20.

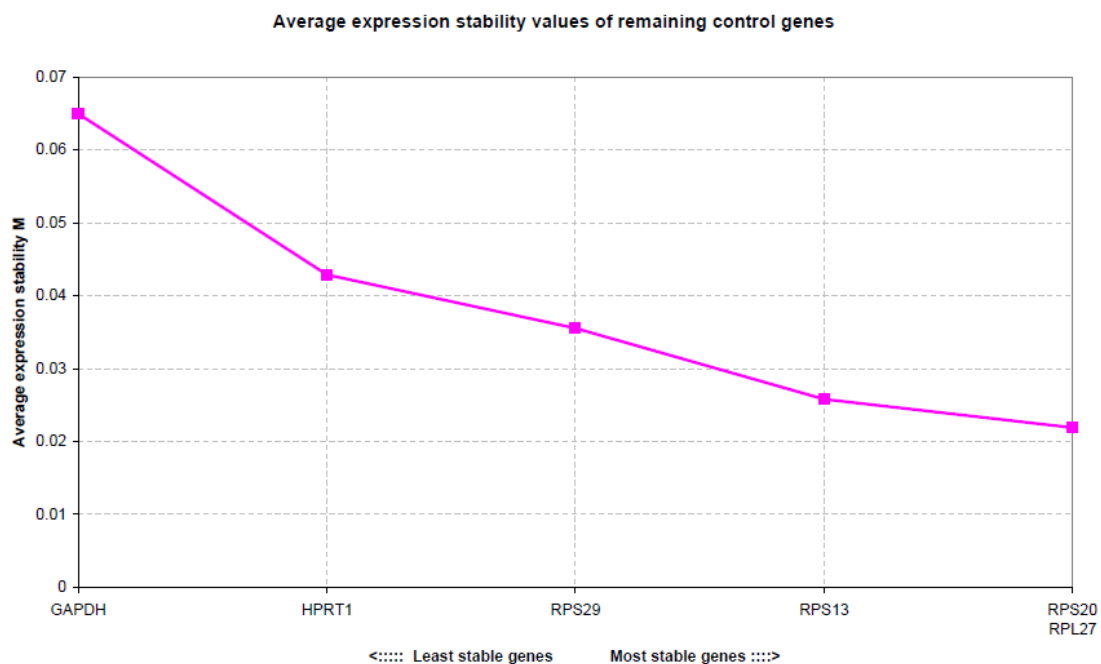


Figura 27: Análise da estabilidade ou menor variação de expressão dos genes candidatos a endógeno analisados em RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real) considerando ambos os grupos da pesquisa: GT (grupo treinamento) e GTL (grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade).

Após identificação dos genes endógenos apropriados, iniciamos o processo de validação dos resultados obtidos nos experimentos de *microarrays*. Essa validação consistiu em verificar se os genes identificados como diferencialmente expressos nos *microarrays* possui o mesmo padrão de expressão (mais ou menos expresso – *up* ou *down regulated*) e se a magnitude de mudança nessa expressão (*fold change* – FC) é semelhante aos resultados obtidos nas análises em RT-PCR. Dessa maneira, sintetizamos pares de *primers* para genes importantes no contexto do treinamento físico e laserterapia de baixa intensidade, os quais foram identificados como diferencialmente expressos intra e intergrupos. No entanto, com intuito de confirmar a validação dos resultados, sintetizamos mais três pares de *primers* para os genes CS (*citrate synthase*),

SOD2 (*superoxide dismutase 2, mitochondrial*) e NFkB (*nuclear factor NF-kappa-B*) que não foram significativamente expressos nos *microarrays*, tanto nos testes pareados (intragrupos) e não pareados (intergrupos) para, dessa maneira, confirmar por RT-PCR, os resultados encontrados nas análises estatísticas dos *microarrays*. O desenho dos *primers* desses genes segue na tabela 9 abaixo:

NM (Gene)	Gene-Primer	Sequência
NM_000245 (MET)	MET_RT_F MET_RT_R	5' GCTCCGTATCCTTCTCTGTTG 3' 5' GTGTGGACTGTTGCTTTGAC 3'
NM_002478 (MYOD1)	MYOD1_RT_F MYOD1_RT_R	5' CGAACCCCAACCCGATATAC 3' 5' GGGCATTTAAGTTCAATCTTTTGG 3'
NM_005259 (MSTN= GDF8)	MST_RT_F MST_RT_R	5' TGATCTTGCTGTAACCTTCCC 3' 5' TCGTGATTCTGTTGAGTGCTC 3'
NM_032588 (TRIM63)	TRIM63_RT_F TRIM63_RT_R	5' GCCACCTTCCTCTTGACTG 3' 5' CGTCTGCTATGTGCTCTAAATCC 3'
NM_004958 (mTOR= FRAP1)	mTOR_RT_F mTOR_RT_R	5' CTGAACTGGAGGCTGATGG 3' 5' TGGTCCCCGTTTTCTTATGG 3'
NM_005163 (AKT1)	AKT1_RT_F AKT1_RT_R	5' GAAGGACCCCAAGCAGAG 3' 5' CTTGAAGGGTGGGCTGAG 3'
NM_003998 (NFkB1)	NFkB1_RT_F NFkB1_RT_R	5' GAACCACACCCCTGCATATAG 3' 5' GCATTTTCCCAAGAGTCATCC 3'
NM_004077 (CS)	CS_RT_F CS_RT_R	5' TGAGGGTGGCAATGTAAGTG 3' 5' TTAGCCAGACAAGCACTTCC 3'
NM_000636 (SOD2)	SOD2_RT_F SOD2_RT_R	5' CCTGGAACCTCACATCAACG 3' 5' GCTATCTGGGCTGTAACATCTC 3'

Tabela 9. Desenho dos pares de *primers* dos genes sintetizados e utilizados para a validação dos resultados dos experimentos de *microarrays*.

Conforme descrito nas análises estatísticas, foram realizados testes pareados para os grupos GTL e GT, e um teste não pareado entre esses grupos (condição pós-treinamento). Também foram geradas listas de genes mais e menos expressos de forma significativa ($P < 0,05$). Considerando os genes diferencialmente expressos nos grupos GTL e GT, identificamos que houve um aumento de expressão significativa para os genes mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) e AKT1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) e um decréscimo também significativo na expressão dos genes MSTN (*myostatin*) e TRIM63 (*tripartite motif containing 63, E3 ubiquitin protein ligase*) apenas para o grupo GTL.

Com intuito de validar esses resultados dos experimentos de *microarrays*, analisamos a expressão dos genes da tabela 10 em RT-PCR seguindo a literatura científica (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008) e considerando a magnitude de mudança (*fold change* – FC) desses genes alvos (NEUBAUER *et al.*, 2013). Para o cálculo do FC em RT-PCR, consideramos o método comparativo de limiar de ciclo (*cycle threshold* – Ct), também conhecido como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Nesse método, é importante ressaltar que o Ct do gene alvo quantificado em RT-PCR é subtraído do Ct do gene endógeno também quantificado em RT-PCR. Por isso, é imprescindível a identificação de genes endógenos estáveis nas diferentes condições do estudo para deixar em evidência apenas as mudanças de FC do gene alvo.

Como temos dois momentos de avaliação nessa pesquisa (pré e pós-treinamento) analisamos o Ct de cada gene alvo e também do endógeno mais estável (RPS20, de acordo com as análises do software geNorm) nesses dois momentos. Assim, consideramos a situação pré-treinamento como a linha de base e de valor 1. A partir dessa linha de base, caso ocorra o aumento de expressão do gene alvo, o valor dos cálculos para $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é superior ao valor 1 e esse valor é considerado como o *fold change*

(FC) de expressão. Mas se houver diminuição na expressão do gene alvo, esse valor será menor que 1 e então calculamos o *fold change* como: $-1/\text{valor de expressão}$ (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Por fim, para ambas as metodologias (*microarrays* e RT-PCR), consideramos a magnitude de mudança ou FC (*fold change*) dos genes alvos para as comparações e validação dos resultados obtidos nos *microarrays*.

Abaixo seguem as figuras 28 e 29 que compreendem 8 e 6 gráficos, respectivamente, exibindo o *fold change* obtido nas análises estatísticas pareadas de *microarrays* e RT-PCR para os genes AKT1, mTOR, MSTN e TRIM63 [Figura 28] e CS, SOD2 e NFkB [Figura 29] para os grupos GTL e GT (análises pareadas).

Destacamos a grande semelhança no comportamento e valores dos resultados obtidos nos *microarrays* e RT-PCR para a parte A da figura 28 (genes AKT1, mTOR, MSTN e TRIM63) do grupo GTL. Já a parte B da figura 28 (grupo GT), os genes AKT1, mTOR, MSTN e TRIM63 não foram diferencialmente expressos ($P > 0,05$) com referência à linha de base (valor 1) nas análises estatísticas pareadas nos *microarrays* e RT-PCR. Na Figura 29, a parte A (grupo GTL) e B (grupo GT) não foram significativamente expressos nos *microarrays* com confirmação desses resultados por RT-PCR. Ainda, considerando o processo de validação dos resultados obtidos nas análises de expressão gênica por *microarrays*, selecionamos os genes MYOD1 (*myogenic differentiation 1*), MET (*met proto-oncogene*) e TRIM63 (*tripartite motif containing 63, E3 ubiquitin protein ligase*) dentre os genes diferencialmente expressos apontados no teste t não pareado entre grupos GTL (pós-treinamento) *versus* GT (pós-treinamento). A figura 30 compreende os gráficos exibindo o *fold change* obtido nessas análises com as validações por RT-PCR para esses genes. O *fold change* da última coluna (*microarray*) é muito semelhante à diferença entre o *fold change* dos grupos

GTL e GT pós-treino, analisada em RT-PCR. Ressaltamos ainda que o grupo GT pós-treino foi tomado como linha de base para as comparações intergrupos.

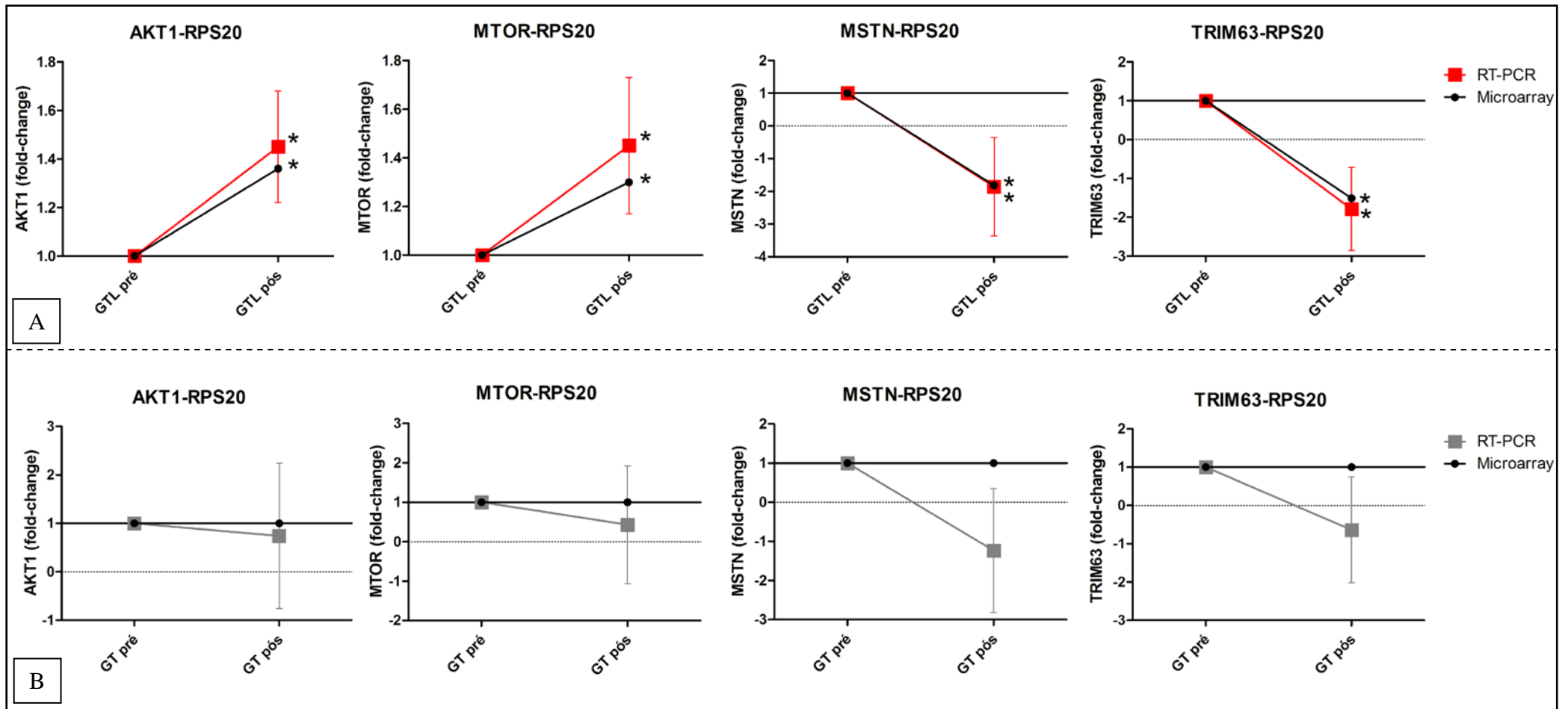


Figura 28: **A)** Gráficos que representam 4 genes (AKT1, mTOR, MSTN e TRIM63) significativamente expressos nas análises pareadas de *microarrays* e confirmados por RT-PCR para o grupo GTL. **B)** Gráficos que representam os mesmos genes (AKT1, mTOR, MSTN e TRIM63) que não foram diferencialmente expressos nas análises pareadas de *microarrays* e confirmados por RT-PCR para o grupo GT. Todos os resultados foram expressos em magnitude de mudança (*fold change*) e a validação desses resultados foi confirmada por RT-PCR. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real; GTL= grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade; GT= grupo treinamento; * significância estatística ($P < 0,05$) (pré versus pós-treinamento).

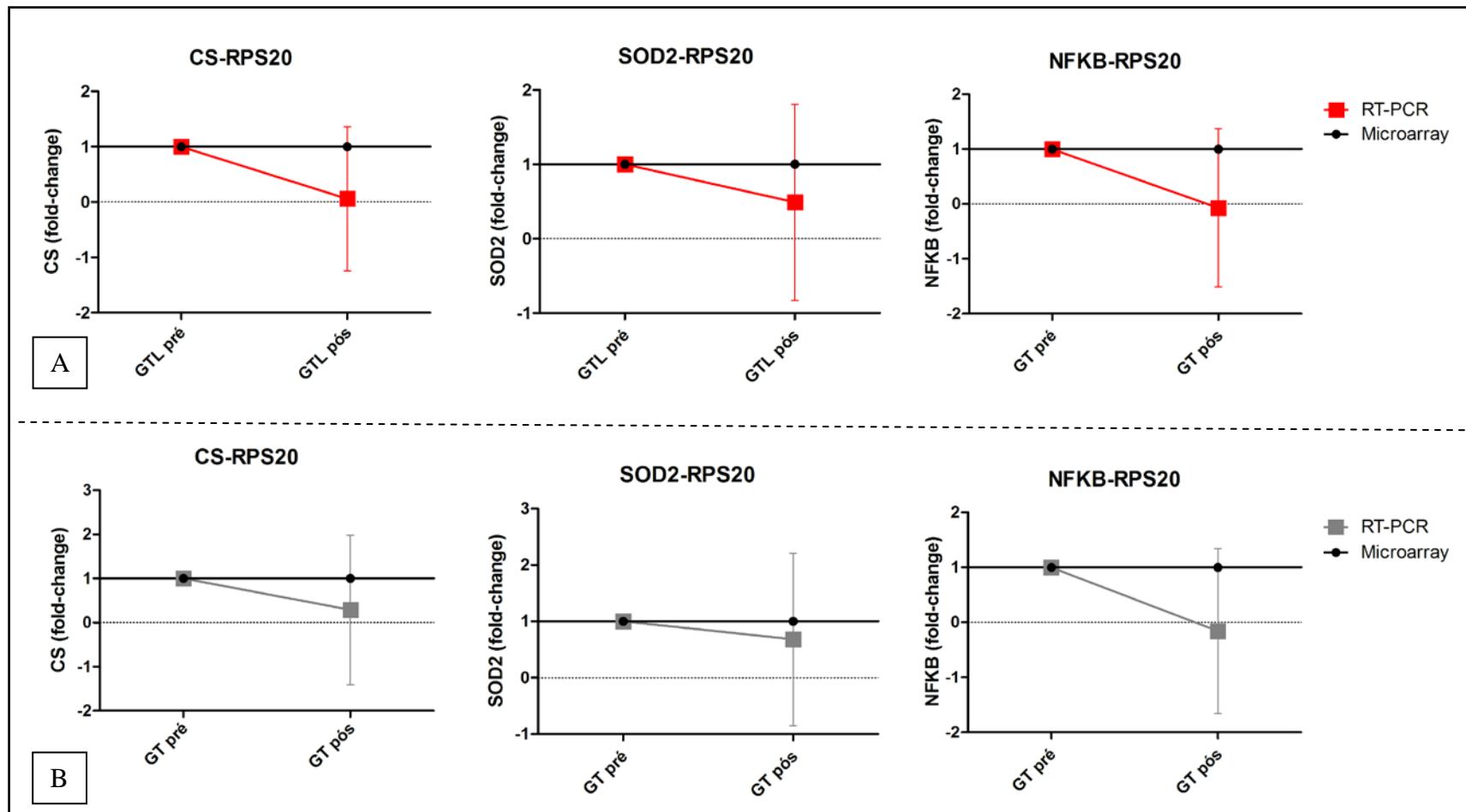


Figura 29: **A)** Gráficos que representam 3 genes (CS, SOD2 e NFKB) não significativamente expressos nas análises pareadas de *microarrays* e confirmados por RT-PCR para o grupo GTL. **B)** Gráficos que representam os mesmos genes (CS, SOD2 e NFKB) que também não foram diferencialmente expressos nas análises pareadas de *microarrays* e confirmados por RT-PCR para o grupo GT. Todos os resultados foram expressos em magnitude de mudança (*fold change*) e a validação desses resultados foi confirmada por RT-PCR. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real; GTL= grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade; GT= grupo treinamento.

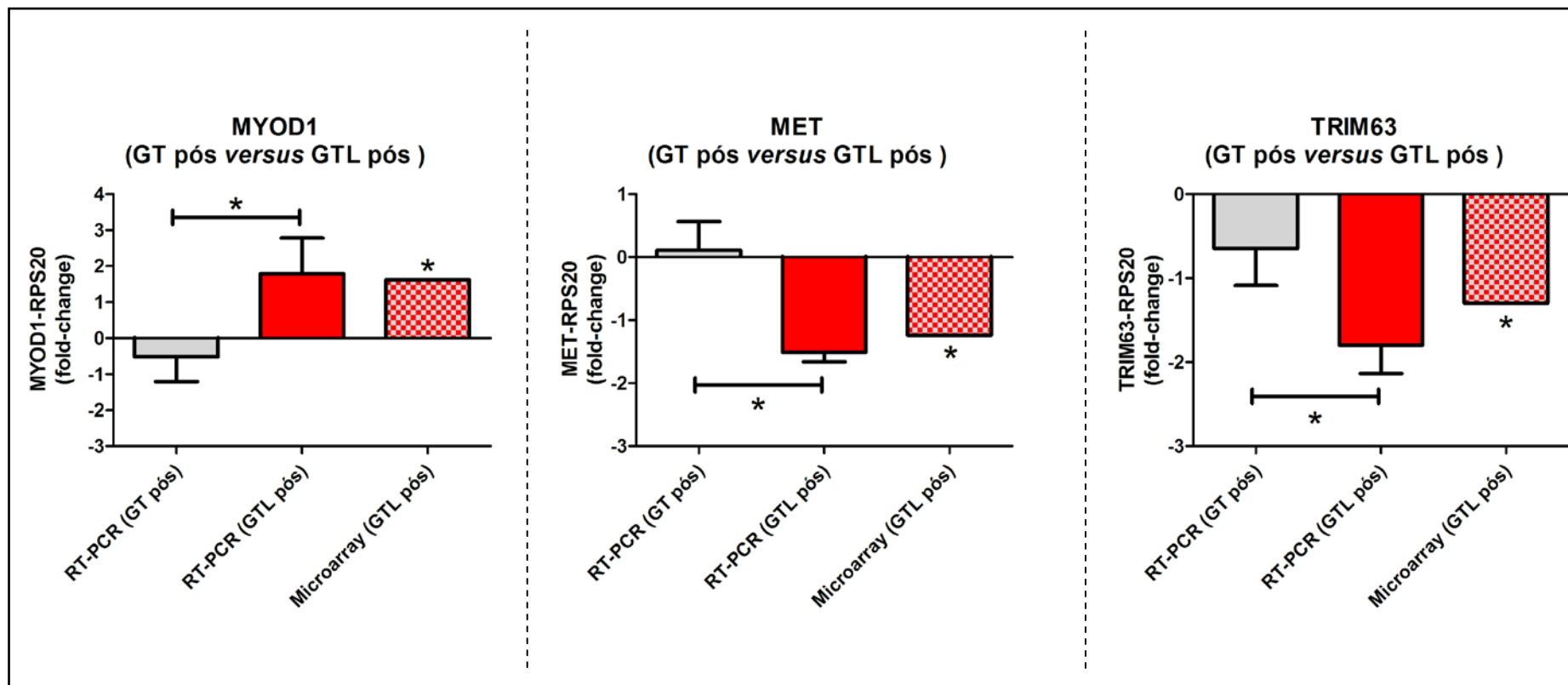


Figura 30: Gráficos que representam 3 genes diferencialmente expressos nas análises não pareadas de *microarrays* entre os grupos GT e GTL. Todos os resultados foram expressos em magnitude de mudança (*fold change*) e a validação desses resultados foi confirmada por RT-PCR. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real; GTL= grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade; GT= grupo treinamento; * significância estatística ($P < 0,05$) (GT pós-treinamento *versus* GTL pós-treinamento).

Abaixo segue a tabela 10 (análises pareadas) e a tabela 11 (análises não pareadas) das análises estatísticas dos genes utilizados na validação dos resultados dos *microarrays*. Nessas tabelas estão todos os valores de *P* e a magnitude de mudança (*fold change*) dos genes alvos e a qual grupo pertence esses resultados. Dessa maneira, consideramos validados os resultados obtidos nos *microarrays*.

Gene	Grupo	Análises pareadas			
		Fold-Change		P valor	
		Microarray	RT-PCR	Microarray	RT-PCR
AKT1	GTL (pré x pós)	1,36*	1,45±0,23*	0,022*	0,012*
AKT1	GT (pré x pós)	1,00	0,74±1,50	<i>P</i> > 0,05	0,413
mTOR	GTL (pré x pós)	1,30*	1,45±0,28*	0,002*	0,027*
mTOR	GT (pré x pós)	1,00	0,42±1,49	<i>P</i> > 0,05	0,610
MSTN	GTL (pré x pós)	-1,82*	-1,86±1,50*	0,035*	0,013*
MSTN	GT (pré x pós)	1,00	-1,23±1,58	<i>P</i> > 0,05	0,084
TRIM63	GTL (pré x pós)	-1,51*	-1,79±1,07*	0,005*	0,002*
TRIM63	GT (pré x pós)	1,00	-0,64±1,38	<i>P</i> > 0,05	0,136
CS	GTL (pré x pós)	1,00	0,06±1,30	<i>P</i> > 0,05	0,175
CS	GT (pré x pós)	1,00	0,29±1,69	<i>P</i> > 0,05	0,292
SOD2	GTL (pré x pós)	1,00	0,49±1,32	<i>P</i> > 0,05	0,309
SOD2	GT (pré x pós)	1,00	0,68±1,53	<i>P</i> > 0,05	0,784
NFKB	GTL (pré x pós)	1,00	-0,07±1,44	<i>P</i> > 0,05	0,169
NFKB	GT (pré x pós)	1,00	-0,16±1,50	<i>P</i> > 0,05	0,315

Tabela 10. Análises pareadas dos genes alvo para a validação dos resultados dos *microarrays* por RT-PCR. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real; GTL= grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade; GT= grupo treinamento; * significância estatística (*P* < 0,05).

Análises não pareadas (GTL pós versus GT pós)						
Gene	Grupos	Fold-Change			p valor	
		Microarray	RT-PCR		Microarray	RT-PCR
			GTL pós	GT pós		
MYOD1	GTL x GT	1,62*	1,78±2,79*	-0,51±2,17	0,023*	0,033*
MET	GTL x GT	-1,24*	-1,50±0,40*	0,11±1,35	0,036*	0,004*
TRIM63	GTL x GT	-1,30*	-1,79±1,07*	-0,64±1,38	0,034*	0,026*

Tabela 11. Análises não pareadas dos genes alvo para a validação dos resultados dos *microarrays* por RT-PCR. RT-PCR= Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real; GTL= grupo treinamento associado à laserterapia de baixa intensidade; GT= grupo treinamento; * significância estatística ($P < 0,05$).

Análise global da função biológica dos genes diferencialmente expressos nos *microarrays*:

Para as análises de identificação da função biológica dos genes diferencialmente expressos nas análises por *microarrays*, utilizamos o software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) da Ingenuity Systems. Nessas análises, consideramos apenas os genes que tiveram um percentual de mudança (*fold change* – FC) acima de 50%, ou seja, FC= $\pm 1,5$ com significância estatística. Dessa maneira, foram analisados 181 genes mais expressos e 179 genes menos expressos no grupo GT; 239 genes mais expressos e 214 genes menos expressos no grupo GTL; 216 genes mais expressos e 283 genes menos expressos nas comparações entre GT e GTL pós-treinamento. Também, analisamos separadamente os genes relacionados às mitocôndrias celulares, uma vez que é bem estabelecida a relação entre a fototerapia por laser de baixa intensidade (LLLT) e essas organelas (KARU, 1999).

A característica principal do IPA é o estabelecimento de conexões entre os genes do banco de dados do usuário, bem como de genes adicionais descritos na literatura e que possuem conexão direta com tal via de sinalização. Assim, estabelecemos vias de sinalizações entre esses genes do banco de dados de cada grupo e o banco de dados da

literatura que está incorporado no software IPA da Ingenuity Systems. Nesse estudo nos restringimos apenas a mostrar as vias de sinalizações que possuem os genes mais e menos expressos do banco de dados de cada grupo (GT; GTL; GT pós-treinamento *versus* GTL pós-treinamento) e que foram identificados e alocados pelo IPA.

Para o grupo GT, a figura 31 representa as conexões e sinalizações dos genes mais e menos expressos identificados pelo IPA de forma global; e a figura 32 os genes relacionados às mitocôndrias celulares desse grupo.

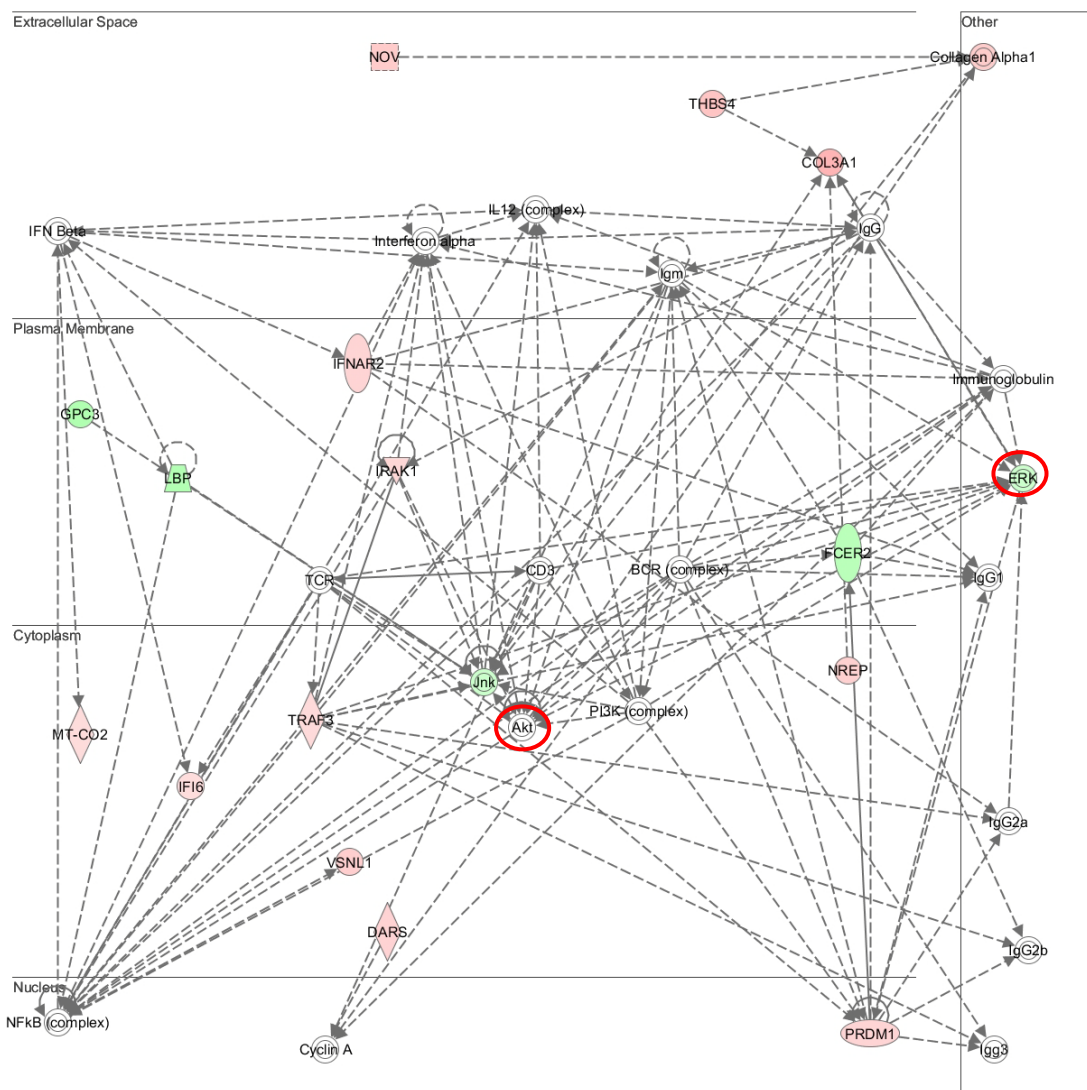


Figura 31. Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de forma global para o grupo treinamento (GT). Genes em branco não pertencem ao banco de dados do grupo analisado, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações.

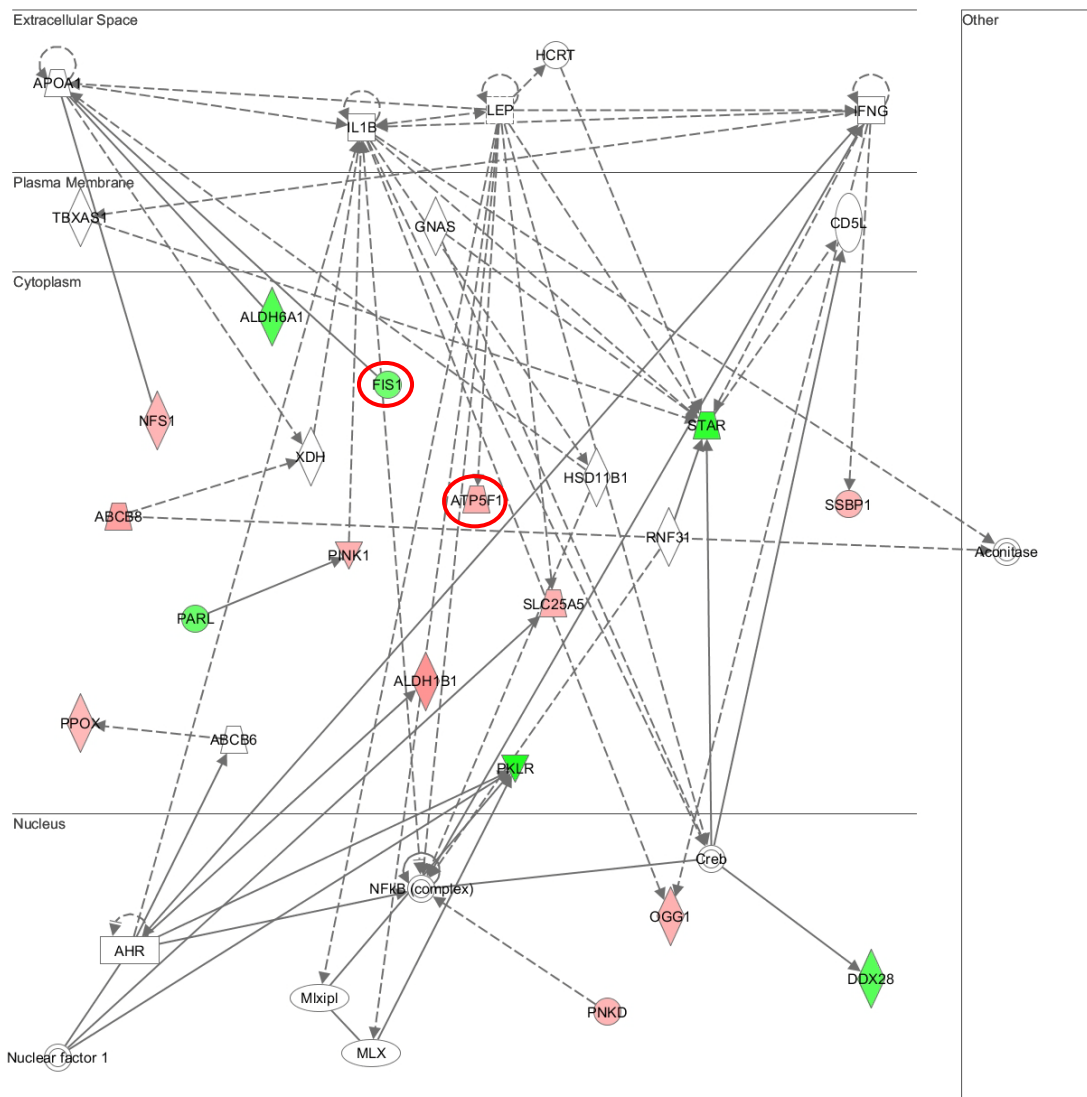


Figura 32. Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de genes relacionados às mitocôndrias celulares do grupo treinamento (GT). Genes em branco não pertencem ao banco de dados do grupo analisado, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações.

De maneira semelhante à análise realizada para o grupo GT, a figura 33 representa as conexões e sinalizações dos genes mais e menos expressos identificados pelo IPA de forma global para o grupo GTL; e a figura 34 para genes relacionados às mitocôndrias celulares desse grupo.

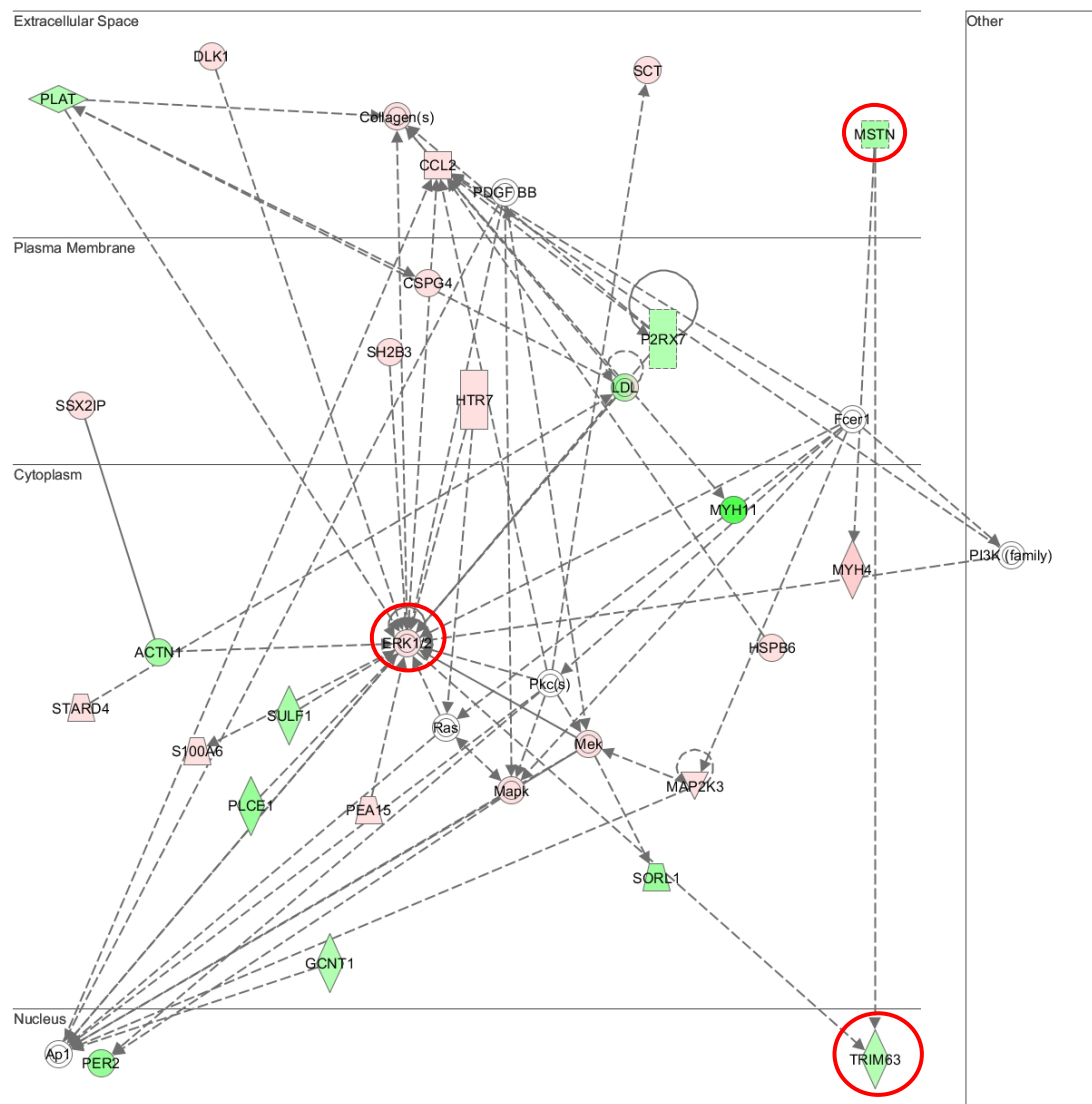


Figura 33. Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de forma global para o grupo treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade (GTL). Genes em branco não pertencem ao banco de dados do grupo analisado, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações.

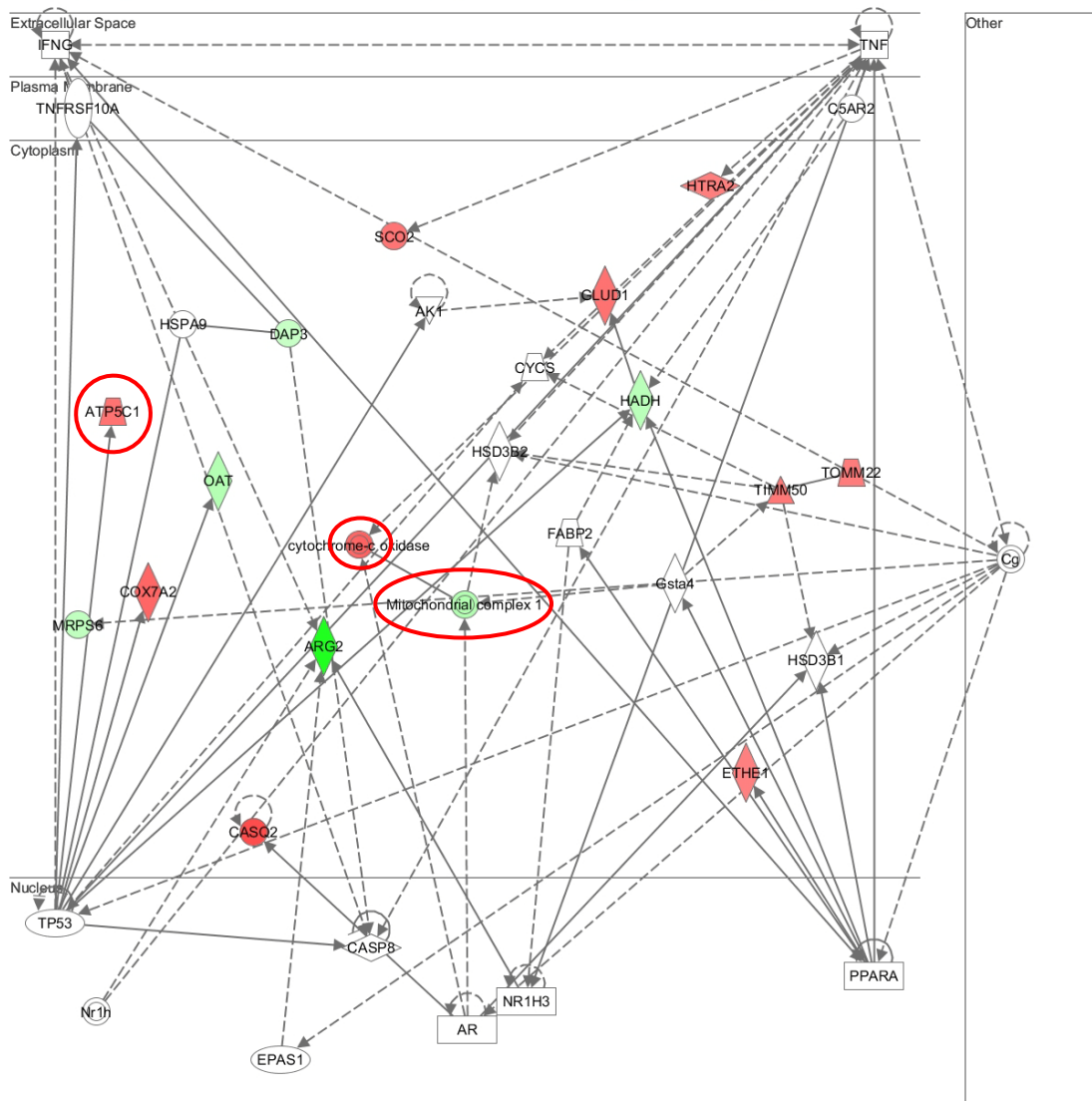


Figura 34. Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de genes relacionados às mitocôndrias celulares do grupo treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade (GTL). Genes em branco não pertencem ao banco de dados do grupo analisado, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações.

Por fim, foram realizadas análises semelhantes às supracitadas entre os grupos GT pós-treinamento e GTL pós-treinamento. As figuras 35 e 36 representam as conexões e sinalizações dos genes mais e menos expressos identificados pelo IPA de forma global para as análises intergrupos; e a figura 37 para genes relacionados às mitocôndrias celulares.

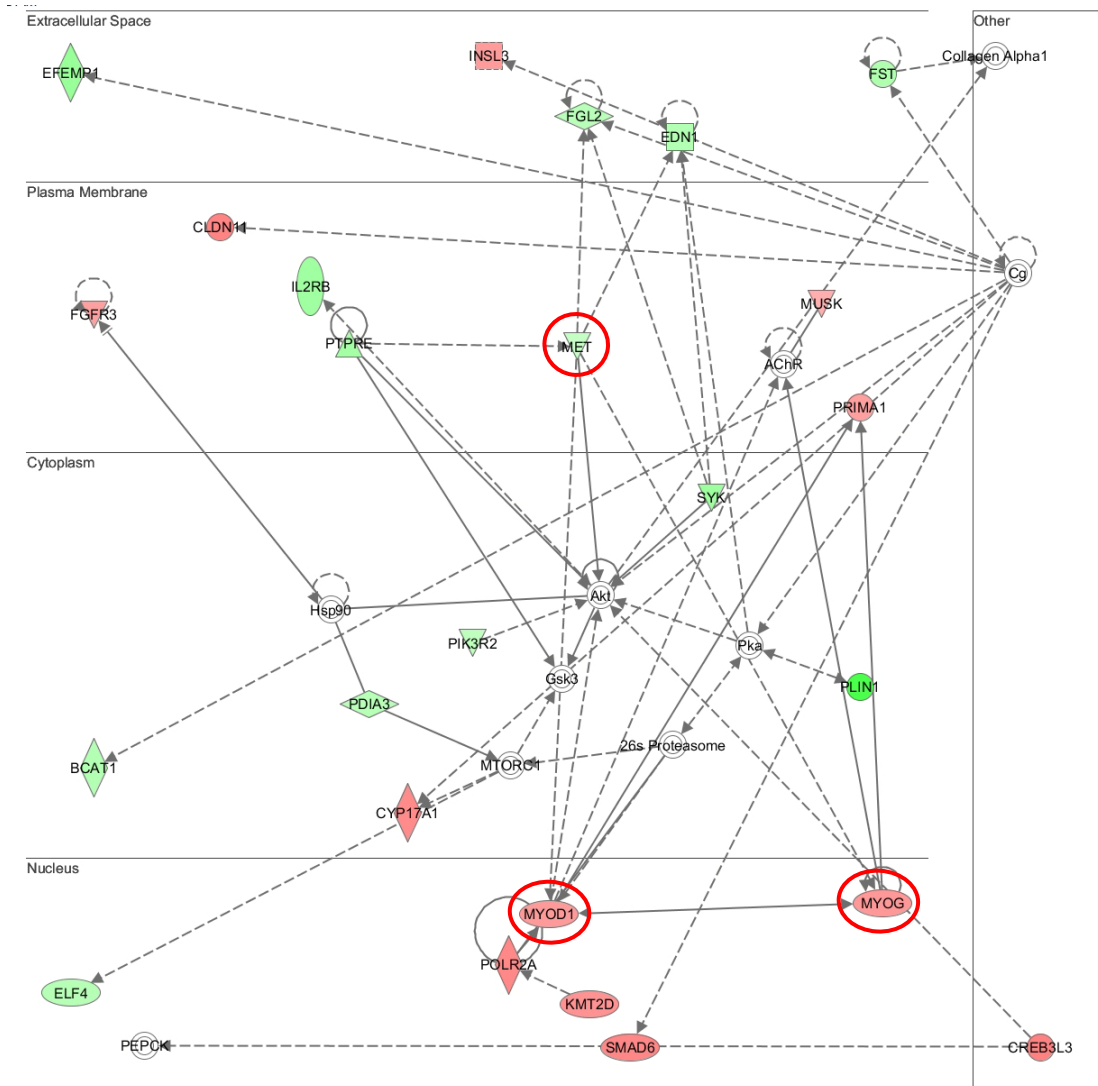


Figura 35. Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de forma global para o grupo treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade (GTL) pós-treinamento em relação ao grupo treinamento (GT) pós-treinamento. Genes em branco não pertencem ao banco de dados dos grupos analisados, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações.

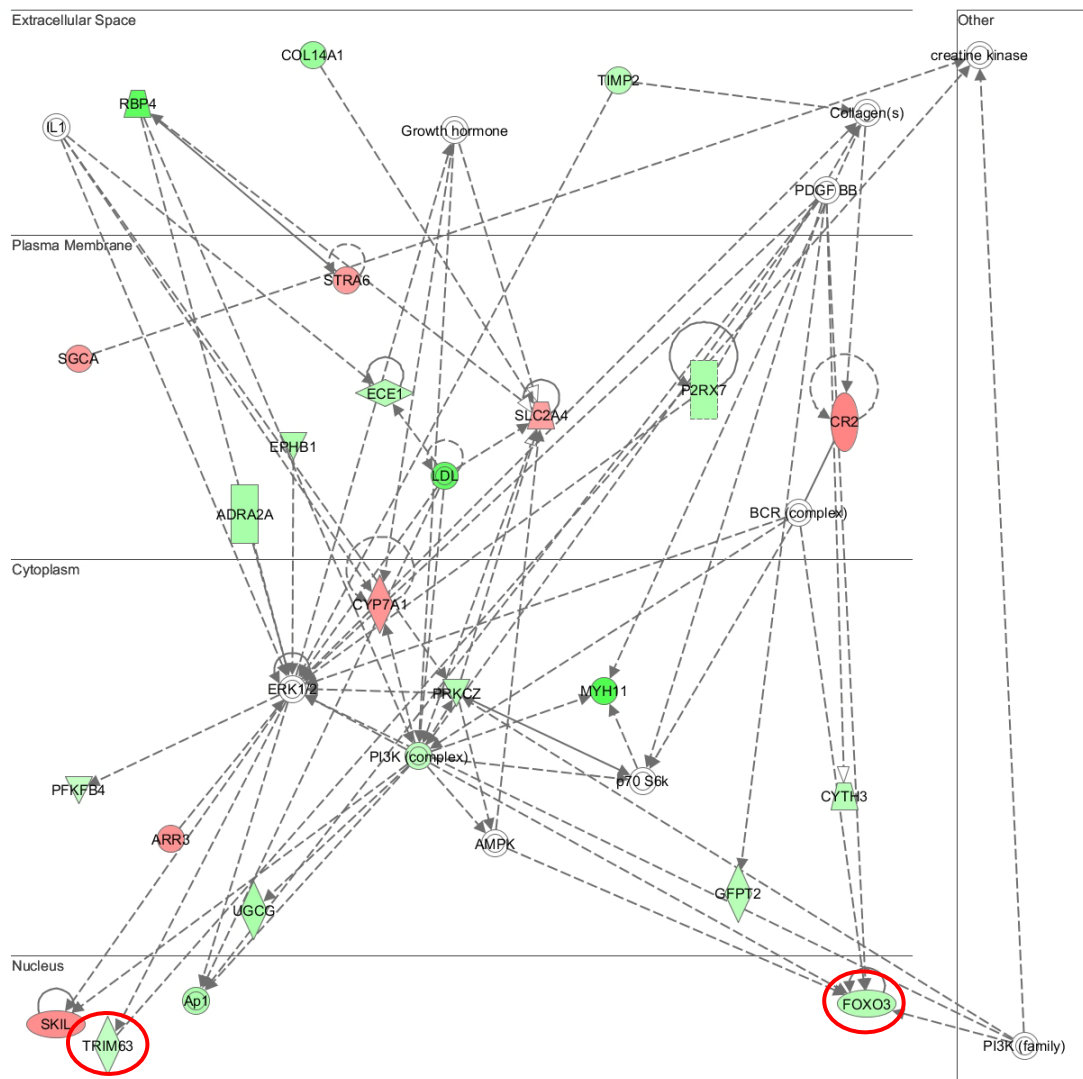


Figura 36. Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) de forma global para o grupo treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade (GTL) pós-treinamento em relação ao grupo treinamento (GT) pós-treinamento. Genes em branco não pertencem ao banco de dados dos grupos analisados, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações.

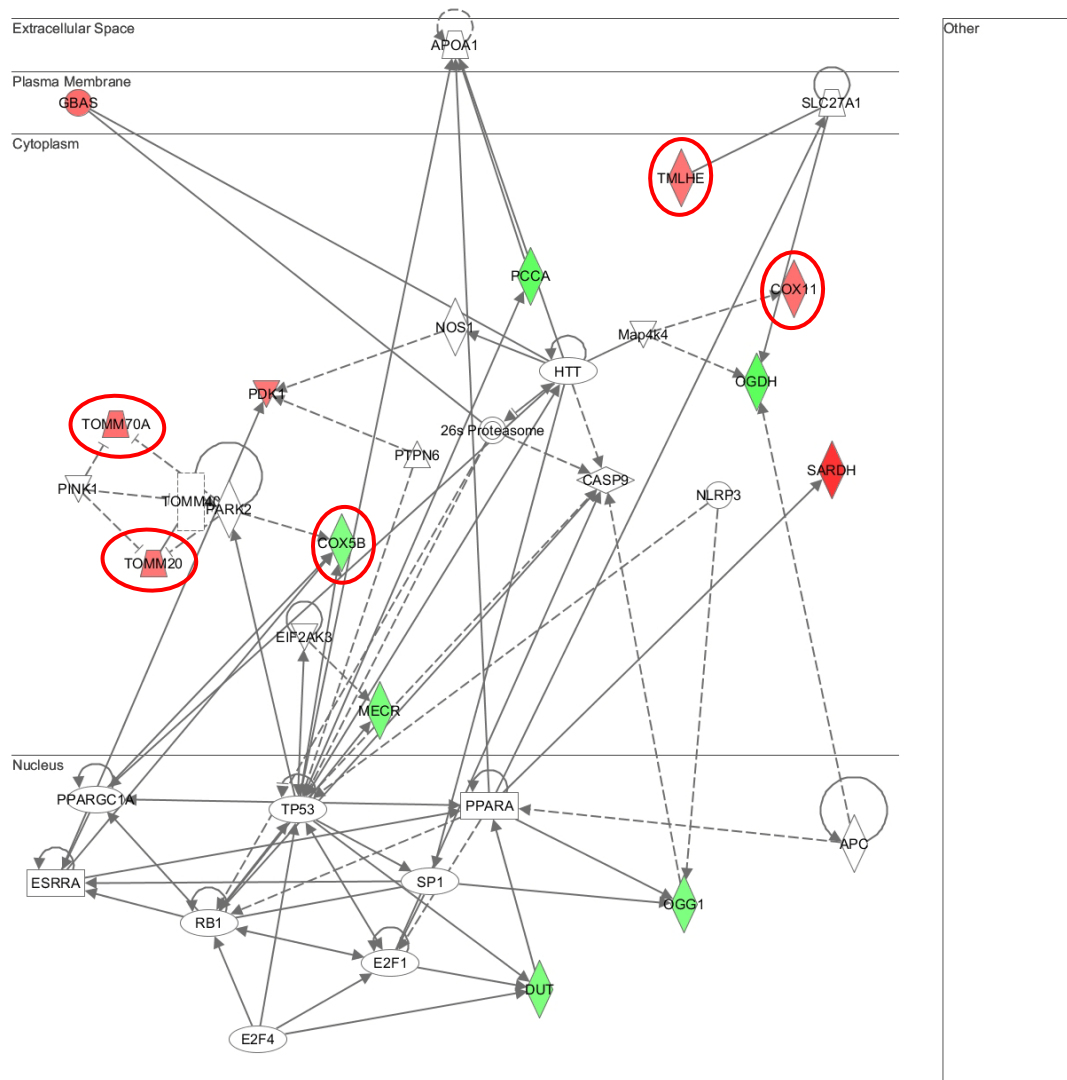


Figura 37. Genes mais expressos (intensidade da cor vermelha significa mais expressão) e menos expressos (intensidade da cor verde significa menos expressão) relacionados às mitocôndrias celulares. Análises entre os grupos GTL (treinamento associado à laserterapia da baixa intensidade) pós-treinamento em relação ao GT (grupo treinamento pós-treinamento). Genes em branco não pertencem ao banco de dados dos grupos analisados, mas foram adicionados pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) para estabelecer as redes de sinalizações.

DISCUSSÃO

Apesar dos efeitos da fototerapia de baixa intensidade já reportados pela literatura, considerando a luz emitida pela terapia laser (*low-level laser therapy – LLLT*) e terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*), sobre o desempenho muscular em estudos experimentais e clínicos (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013), esse é o primeiro estudo que investigou os efeitos da LLLT sobre a modulação da expressão gênica global do tecido muscular humano irradiado por LLLT durante um programa de treinamento físico de força.

Após o programa de treinamento, ambos os grupos treinados aumentaram o desempenho muscular em relação ao grupo controle. No entanto, o grupo que treinou e recebeu a LLLT após cada sessão de treinamento (grupo GTL) teve maiores incrementos percentuais de carga no teste de 1RM e melhor desempenho muscular em dinamometria isocinética quando comparado ao grupo treinamento (GTL) (Ver tabela 6). No entanto, o melhor desempenho muscular do grupo GTL foi apenas a primeira etapa para se identificar quais são os possíveis genes modulados pela LLLT e que podem estar relacionados à melhora de desempenho muscular em humanos. Nesse contexto, já existem dados na literatura que demonstram associações dos níveis de expressão de determinados genes em função da modalidade esportiva praticada (STEPTO *et al.*, 2009) e genes candidatos ao melhor desempenho físico (BRAY *et al.*, 2009; PERUSSE *et al.*, 2013).

Dessa maneira, realizamos análises de expressão gênica global por *microarrays* e também analisamos as redes de interações gênicas por meio do software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). Dentre os diversos genes identificados nas análises pareadas e não pareadas, destacamos os genes relacionados às mitocôndrias celulares, proliferação

celular, células satélites musculares, síntese de proteínas (hipertrofia muscular) e degradação de proteínas (atrofia muscular), alocados em redes de interações gênicas que tiveram maiores expressões e/ou quantidade de transcritos em uma mesma rede.

Para o grupo GT nas análises pareadas, não houve modulação significativa do gene AKT1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) e mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) relacionado à hipertrofia muscular (COFFEY e HAWLEY, 2007; HAWLEY, 2009), bem como para a proliferação celular ERK (*mitogen-activated protein kinase*) (GAO e XING, 2009). Considerando genes relacionados às mitocondriais, o gene FIS1 (*fission 1 – mitochondrial outer membrane*) foi significativamente menos expresso e o gene ATP5F1 (*ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1*) foi mais expresso, sugerindo que houve uma sinalização significativa para as mitocôndrias musculares desse grupo não se proliferarem e/ou se dividirem (LOSON *et al.*, 2013), bem como um possível aumento da atividade do complexo V mitocondrial (ATP sintase) (MASHA; HOURELD e ABRAHAMSE, 2013).

Em contrapartida, nas análises pareadas do grupo GTL, houve um aumento na expressão do gene ERK (*mitogen-activated protein kinase*), indicando uma proliferação celular (GAO e XING, 2009), corroborado pelo aumento de expressão dos genes AKT1 e mTOR (hipertrofia muscular) e pela menor expressão dos genes TRIM63 (*tripartite motif containing 63, E3 ubiquitin protein ligase*) e MSTN (*myostatin*). O gene TRIM63, também conhecido como MuRF1 (*muscle-specific ring finger protein 1*), está diretamente relacionado à degradação de proteínas (atrofia muscular), pois codifica uma enzima do tipo ligase que conecta o complexo ubiquitina-proteosoma à proteínas alvo para degradá-las (COFFEY e HAWLEY, 2007; MCCARTHY, 2014). Por sua vez, o gene MSTN é responsável pela regulação negativa do crescimento de células de

músculo esquelético durante a fase de desenvolvimento embrionário, bem como na fase adulta (SCHUELKE *et al.*, 2004). Considerando os genes relacionados às mitocôndrias, nas análises pareadas do grupo GTL identificamos que os genes ATP5C1 (*ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1*) e citocromo c oxidase (Cox) foram significativamente mais expressos, sugerindo uma maior atividade da cadeia transportadora de elétrons e síntese de ATP mediada pela LLLT. Esses resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que estudos prévios já demonstraram a dependência da absorção da luz pela Cox (efeito primário) que conduz ao aumento da síntese de ATP mitocondrial (KARU, 1999). No entanto, o complexo mitocondrial 1 foi significativamente menos expresso, contrariando estudos prévios sobre o aumento da atividade de todos os complexos da cadeia transportadora de elétrons (SILVEIRA *et al.*, 2009), mas sugerindo que outros mecanismos ou rotas metabólicas foram mais utilizadas para a produção de ATP pelas mitocôndrias, como talvez a oxidação de lactato durante e após os exercícios do treinamento (BROOKS *et al.*, 1999).

As comparações intergrupos no momento pós-treinamento (GT *versus* GTL) revelaram modulações importantes em genes relacionados às células satélites musculares: MET (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*), MYOD1 (myogenic differentiation 1) e MYOG (*myogenin – myogenic factor 4*) (HAWKE e GARRY, 2001; CHEN e GOLDHAMER, 2003; CHARGE e RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN e RUDNICKI, 2005; KUANG e RUDNICKI, 2008; WILBORN *et al.*, 2009). O gene MET foi significativamente menos expresso no grupo GTL na condição pós-treinamento comparado ao grupo GT. Esse gene está relacionado ao estado de quiescência (dormência) das células satélites e sugere que houve uma ativação dessas células para o reparo muscular, hipertrofia e/ou melhora do domínio mionuclear em

função das possíveis microlesões oriundas do treinamento físico (PETRELLA *et al.*, 2008). Essas hipóteses são reforçadas pelo aumento de expressão dos genes MYOG e MYOD1, os quais são responsáveis pela diferenciação de células satélites em células musculares (HAWKE e GARRY, 2001; CHEN e GOLDHAMER, 2003; CHARGE e RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN e RUDNICKI, 2005; KUANG e RUDNICKI, 2008; WILBORN *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem que o processo de reparo muscular frente às microlesões oriundas do treinamento físico de força foi mais eficiente com o uso da LLLT. Vale destacar que resultados similares em modelo animal de criolesão e tratamento com LLLT identificou aumentos na expressão de MYOD1 e MYOG daqueles animais tratados com LLLT, conduzindo a um melhor reparo muscular (ASSIS *et al.*, 2012).

Os genes TRIM63 e FOXO3 (*forkhead box O3*) foram menos expressos no grupo GTL pós-treinamento quando comparado ao grupo GT também no pós-treinamento. A diminuição da expressão desses genes sugere que o processo de atrofia muscular ou degradação de proteínas foi menor nesse grupo. Essa hipótese é baseada na função das proteínas que esses genes codificam, uma vez que estão intimamente relacionados ao equilíbrio entre a síntese (hipertrofia) e a degradação (atrofia) de proteínas musculares. Como reportado anteriormente, o gene TRIM63 media a degradação de proteínas via complexo ubiquitina-proteosoma (COFFEY e HAWLEY, 2007; MCCARTHY, 2014) e o gene FOXO3 é acreditado ser um dos iniciadores de apoptose celular e consequente atrofia muscular, pois é responsável pela transcrição de genes como TRIM63 (MuRF1) e MAFbx/atrogen-1 (MCCARTHY, 2014).

Por fim, identificamos um aumento na expressão de genes mitocondriais no grupo GTL comparado ao GT no pós-treinamento. Os genes COX11 (*COX11 cytochrome c oxidase copper chaperone*), TOMM22 (*translocase of outer*

mitochondrial membrane), TOMM70A (*translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A*) e TMLHE (*trimethyllysine hydroxylase, epsilon*) foram significativamente mais expressos e o gene COX5B (*cytochrome c oxidase subunit Vb*) foi menos expresso. O gene COX11 aponta para uma maior síntese da enzima Cox, especificamente para a formação dos centros de cobre [Cu(B)] e magnésio dessa enzima que são importantes na transferência dos elétrons da cadeia transportadora de elétrons para o oxigênio (HUANG *et al.*, 2009). Em contrapartida, o gene COX5B, o qual codifica uma das diversas subunidades da enzima Cox, foi menos expresso. Ainda considerando o metabolismo mitocondrial, os genes TOMM22 e TOMM70A, os quais codificam para proteínas de canais da membrana mitocondrial (BERTOLIN *et al.*, 2013), foram mais expressos, sugerindo modulações no transporte de substâncias para dentro das mitocôndrias que podem alterar o metabolismo mitocondrial. Nesse contexto, o gene TMLHE codifica a enzima trimetilisina dioxigenase, a qual participa diretamente na biosíntese de carnitina, responsável pela entrada de ácidos graxos nas mitocôndrias para serem oxidados (ROSENBAUM *et al.*, 2013). A modulação desse gene pode indicar um metabolismo aeróbio mais eficiente para a oxidação de gorduras e conseqüentemente uma redução de gordura corporal.

Os resultados desse estudo reforçam os dados da literatura para o aumento do desempenho muscular com o uso da fototerapia de baixa intensidade (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013), mostrando de forma pioneira as bases moleculares para elucidar alguns dos mecanismos de ação dessa terapia sobre o tecido muscular em humanos. Além disso, acreditamos que os resultados desse estudo irão incentivar novas linhas de pesquisas que poderão, possivelmente, utilizar lasers e LEDs no tratamento de doenças diversas,

como o tratamento de distrofias musculares (FERRARESI e PARIZOTTO, 2013), ou ainda no combate à obesidade.

Fototerapia no treinamento de força: ensaio clínico duplo-cego e controlado com placebo em um par de gêmeos idênticos

Artigo submetido ao periódico *Lasers in Surgery and Medicine*
(ANEXO V)

RESUMO

Contexto e objetivo: A fototerapia de baixa intensidade tem sido usada para a melhora da reparação tecidual e redução de dor. Quando aplicada sobre os músculos esqueléticos, a fototerapia aumenta o desempenho muscular no exercício. Nosso questionamento foi como um par de gêmeos idênticos responderia à fototerapia durante um programa de treinamento de força.

Desenho do estudo/Materiais e Métodos: Nosso estudo usou a fototerapia real ou placebo emitida a partir de um arranjo flexível de LEDs (*light-emitting diodes* – LEDT): $area = 612 \text{ cm}^2$, $\lambda = 850 \text{ nm}$, energia total = 75 J, tempo de terapia = 15 segundos. A LEDT foi sequencialmente aplicada sobre os quadríceps femorais dos gêmeos idênticos imediatamente após cada sessão de treinamento de força que consistiu de exercícios em *leg press* e cadeira extensora 3 vezes por semana durante 12 semanas.

Resultados: Comparado à terapia placebo, a LEDT aumentou o desempenho muscular e reduziu a fadiga, marcadores sanguíneos de dano muscular induzido pelo exercício e a intensidade da dor muscular de início tardio. Análises de expressão gênica a partir de biópsias mostraram uma diminuição na inflamação (IL1- β) e na atrofia muscular (MSTN) com a LEDT. As vias de síntese de proteínas (mTOR) e defesa antioxidante (SOD2) foram superexpressas com a LEDT associada a um aumento no volume muscular mensurado a partir de imagens de ressonância magnética (MRI).

Conclusão: Os resultados sugerem que a LEDT pode ser uma terapia útil para os regimes de treinamento atlético, mas o seu uso pode causar preocupações sobre “doping por luz” se essa terapia se tornar generalizada.

Palavras-chave: terapia LED, LLLT, LEDT, expressão gênica, biópsia, atrofia muscular, hipertrofia muscular

ESTUDO DE CASO

Dois homens de 19 anos; gêmeos idênticos de 1,72 m e 70 kg; jogadores de futebol universitário; vivendo juntos e tendo os mesmos hábitos e dietas foram inscritos nesse estudo randomizado e duplo-cego controlado por placebo. Após assinarem um termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética em pesquisas em seres humanos da Universidade Federal de São Carlos (*Apêndice II*) e registrado no *Clinical Trials* (NCT01770938), eles foram submetidos a uma análise genômica para confirmarem sua condição de gêmeos idênticos (VAN DONGEN *et al.*, 2012). Em seguida, ambos iniciaram um programa de treinamento de força por 12 semanas consecutivas, 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras) combinado com a terapia LED (LEDT) real ou placebo aplicada sequencialmente sobre os quadríceps femorais após cada sessão de treinamento. Antes e após o programa de treinamento, foram realizadas imagens de ressonância magnética (MRI) dos músculos da coxa para se calcular o volume muscular (ROSS *et al.*, 1996; TRACY *et al.*, 2003), e biópsias musculares foram também realizadas no vasto lateral (SCHILLING *et al.*, 2005) para se quantificar mudanças na expressão gênica por meio de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR). Um dinamômetro isocinético, teste de 1 repetição máxima (1RM) e análises de creatina quinase (CK) no sangue avaliaram a fadiga muscular, a máxima carga e o dano muscular, respectivamente. A intensidade da dor muscular de início tardio foi avaliada 24 horas após sessões de treinamento usando uma escala visual analógica (VAS) (CHOW *et al.*, 2009). O treinamento físico combinado com LEDT aumentou o desempenho muscular e promoveu menores níveis de CK e dor. Além disso, a LEDT diminuiu a expressão gênica relacionada à inflamação (*interleukin 1-β* – IL1-β) e atrofia muscular (*myostatin* – MSTN) nos músculos esqueléticos; aumentou a expressão gênica da via de síntese de proteína (*mechanistic target of rapamycin* –

mTOR) e defesa antioxidante (*superoxide dismutase 2* – SOD2), e MRI mostrou um aumento no volume muscular da coxa com o uso da LEDT comparado à terapia placebo.

MÉTODOS

Análises genômicas

Dezesseis locos com repetições curtas seguidas (*short tandem repeats* – STRs) foram investigados para determinar se ambos os irmãos eram gêmeos idênticos. Amostras de DNA foram obtidas de células da mucosa oral usando um *swab* e o DNA foi extraído usando *Qiaamp DNA Mini Kit* (Qiagen). Co-amplificações dos locos D3S1358, vWA, D16S539, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01, FGA, D5S818, D13S317, D7S820, TPOX, CSF1PO, Penta D, Penta E e Amelogenin foram realizadas pela reação em cadeia da polimerase usando *Human ID kit* (QGene, Brazil). Reações de PCR multiplex foram preparadas de acordo com o manual de instruções do fabricante. Todos os locos foram amplificados em termociclador Veriti– 96 (Life Technologies). Os produtos amplificados foram detectados e separados por eletroforese capilar usando um MegaBace 1000 System (GE). Os resultados foram analisados e as denominações dos alelos foram estabelecidas automaticamente usando o software *Fragment Profiler*, versão 1.2 (GE).

Imagens de ressonância magnética (MRI) e volume muscular

Um scanner MAGNETOM C!™ 0,35-T (Siemens) foi usado para adquirir as imagens dos músculos da coxa. As imagens de MRI foram obtidas em T1 spin-eco com 430 ms de tempo de repetição, 26 ms de tempo de eco em matriz de 256 x 256 pixels e seções de 10 mm de espessura, similarmente ao reportado em estudo prévio (ROSS *et*

al., 1996; TRACY *et al.*, 2003). Os voluntários não se alimentaram ou ingeriram líquido 8 horas antes de seus escaneamentos realizados na posição supina (TRACY *et al.*, 2003). Para quantificar o volume dos músculos da coxa, as imagens de MRI foram adquiridas a partir da borda proximal da patela até a espinha anterior e superior, subtraindo os tecidos ósseo e gorduroso. As áreas de secção transversa (CSA) foram mensuradas a cada 4 imagens consecutivas (fatias), estabelecendo uma lacuna de 3 cm entre as mesmas (TRACY *et al.*, 2003), usando o software *Weasis* (v1.1.2). O volume muscular (cm³) de cada fatia foi calculado multiplicando a área de tecido muscular (cm²) pela espessura de cada fatia (10 mm). O volume de todas as lacunas foi calculado usando pirâmides truncadas (ROSS *et al.*, 1996; TRACY *et al.*, 2003) como segue abaixo:

$$V = \sum_{i=1}^N A_i t + h/3 \sum_{i=2}^N [A_{i-1} + A_i + \sqrt{(A_{i-1}A_i)}]$$

One V é volume total da coxa, A é a área de secção transversa do músculo, t é a espessura da fatia de músculo, h é a distância (lacuna) entre cada 4 consecutivas fatias, N é o número de fatias usadas nos cálculos. O volume total foi calculado com a soma do volume das fatias e lacunas da coxa esquerda. O mesmo número de fatias (12) foi usado antes e após o programa de treinamento para ambos os gêmeos. MRI foi realizada na linha de base (antes da biópsia da linha de base) e final (24 horas após a segunda biópsia). A CSA de cada fatia foi quantificada pelo mesmo avaliador n° 1, o qual foi cegado para a terapia (LEDT ou Placebo).

Biópsia muscular

Ambos os gêmeos foram instruídos a não realizarem nenhum tipo de treinamento ou exercício físico durante 7 dias antes da primeira biópsia (linha de base – pré). O fragmento do músculo vasto lateral foi retirado da região correspondente à meia distância entre uma linha imaginária começando no trocânter maior do fêmur até a borda superior da patela (SCHILLING *et al.*, 2005). A pele no local da biópsia foi limpa e aplicada uma anestesia local usando 2% de lidocaína sem vasoconstritor. Em seguida foi realizada uma pequena incisão (aproximadamente 0,5 cm) na pele, tecido subcutâneo e fascia muscular utilizando uma lâmina de bisturi número 11 (SCHILLING *et al.*, 2005). Após esse procedimento, uma agulha de biópsia de 4,5 mm foi inserida para coletar o fragmento muscular. Imediatamente após a sua retirada, o fragmento muscular foi colocado em criotubo livre de DNAses e RNAses, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em -80 °C até as análises de expressão gênica. A biópsia final foi conduzida exatamente 24 horas após a última sessão de treinamento.

Desempenho muscular

Após 3 semanas da biópsia da linha de base, ambos os gêmeos foram avaliados quanto à fadiga muscular por meio do índice de fadiga em dinamômetro isocinético (Multi-Joint System 3; Biodex, New York, NY) e teste de 1RM em *leg press* na linha de base, como descrito previamente na literatura (FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012). O teste de 1RM em cadeira extensora foi conduzido para cada um dos membros inferiores respeitando a amplitude de movimento de 90° a 15° de flexão do joelho. As avaliações finais foram realizadas na 35ª sessão de treinamento. Ambos os gêmeos realizaram todas as avaliações individualmente e foram cegados para os resultados.

Além disso, todos os testes foram realizados pelo mesmo avaliador (n° 1) o qual foi cegado para a terapia aplicada (LEDT ou Placebo).

Programa de treinamento

O programa de treinamento em *leg press* e cadeira extensora foi baseado na literatura para se adquirir o máximo de força muscular e volume (WERNBOM; AUGUSTSSON e THOMEE, 2007). Dois dias após as avaliações de desempenho muscular na linha de base, ambos os gêmeos idênticos iniciaram o programa de treinamento de 12 semanas consecutivas, 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras) de forma cega, ou seja, cada gêmeo não viu o treinamento de seu irmão [Figura 1]. A intensidade de cada sessão de treinamento foi de 80% e 50% da carga determinada pelo teste de 1RM em *leg press* e cadeira extensora, respectivamente (FERRARESI *et al.*, 2011). Cada sessão de treinamento compreendeu 30 repetições em *leg press* (3 séries de 10) mais 30 repetições na cadeira extensora (3 séries de 10). O intervalo de descanso entre as series foi estabelecido em 2 minutos (FERRARESI *et al.*, 2011). Na cadeira extensora, o intervalo de descanso iniciou imediatamente após ambos os membros inferiores realizarem cada série de exercícios. As reavaliações de 1RM em *leg press* e cadeira extensora foram realizadas na 12° e 24° sessão de treinamento, substituindo essas sessões. O avaliador n° 1 supervisionou todas as sessões de treinamento.



Figura 1. Sequencia das atividades durante uma sessão de treinamento. Exercício em *leg press* (primeira atividade); exercício em cadeira extensora (segunda atividade); LEDT ou Placebo imediatamente após os exercícios (terceira atividade). Sigla: Terapia LED= (*light-emitting diode therapy* – LEDT).

Fototerapia usando terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT) ou Placebo

O avaliador n° 2 randomizou os gêmeos no início do estudo para receberem a LEDT ou Placebo. Cada terapia foi aplicada sobre os músculos do quadríceps femoral de ambos os membros inferiores imediatamente após cada sessão de treinamento, inicialmente o membro inferior direito e em seguida o membro esquerdo, tendo essa ordem de aplicação alternada a cada sessão. Ambos os gêmeos foram cegados para as terapias assim como o avaliador n° 2 foi cegado para o desempenho muscular, avaliações de CK e VAS durante o estudo.

A LEDT usou um arranjo flexível de LEDs de 34x18 cm contendo 50 LEDs (850 nm) especialmente construído para pesquisa pela Universidade Federal de São Carlos e Universidade de São Paulo, Brazil [Figura 1]. Cada LED tem uma área de 0,2 cm² e uma potência óptica de 100 mW, irradiando 1,5 J durante 15 segundos. A potência total usada foi de 5.000 mW e uma energia total aplicada de 75 J sobre cada membro inferior. Os parâmetros da LEDT foram mensurados e calibrados usando um medidor de potência óptica PM100D Thorlabs® equipado com um sensor modelo S130C. Todos os parâmetros da LEDT são apresentados na tabela 1.

Um botão escondido no equipamento de LEDT foi acionado pelo avaliador n° 2 durante a terapia Placebo e, assim, o equipamento não emitiu luz (0 mW e 0 J). Devido a natureza invisível da luz com comprimento de 850 nm, ambos os gêmeos não foram capazes de distinguir a LEDT da terapia Placebo. Não houve nenhuma sensação de aquecimento na pele durante a aplicação das terapias.

Tabela 1. Parâmetros da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*)

Número de LEDs: 50 na faixa do infravermelho
Comprimento de onda: 850 nm
Frequência de pulso: contínuo
Potência óptica de cada LED: 100 mW
Potência óptica (arranjo): 5.000 mW
Área de cada LED: 0,2 cm ²
Tamanho do arranjo de LEDs: 612 cm ²
Densidade de potência de cada LED: 500 mW/cm ²
Densidade de potência do arranjo de LEDs: 8,1 mW/cm ²
Tempo de tratamento: 15 seg
Energia total aplicada: 75 J
Densidade de energia de cada LED: 7,5 J/cm ²
Densidade de energia do arranjo de LEDs: 0,122 J/cm ²
Modo de aplicação: em contato com a pele

Marcador bioquímico de lesão muscular e avaliação da intensidade da dor muscular de início tardio

A creatina quinase (CK) foi analisada usando 30 µl de sangue coletado do lóbulo da orelha 5 minutos antes e 24 horas após a 1°, 13°, 25° e 36° sessão de treinamento. A CK foi mensurada em Reflotron Plus[®] *biochemical analyzer* (Roche, DEU) (HORNERY *et al.*, 2007) seguindo o manual de instruções do fabricante. A escala visual analógica para dor (VAS) com 10 cm foi usada para mensurar a intensidade de dor muscular de início tardio (CHOW *et al.*, 2009) 24 horas após a 1°, 13°, 25° e 36° sessão de treinamento. A dor muscular foi induzida através de uma contração voluntária

máxima a 0° de flexão de joelho e sem carga. Essas análises foram realizadas pelo avaliador n° 1, o qual foi cegado para as terapias (LEDT ou Placebo).

Análise de expressão gênica

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR) seguiu as recomendações do *MIQE guidelines* (BUSTIN *et al.*, 2009) e analisou a expressão gênica de SOD2, mTOR, IL1- β e MSTN usando RPS13 como o gene de referência mais estável (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) comparado aos genes GAPDH, HPRT1 e RPS29. O RNA mensageiro das biópsias musculares foram extraídos usando TRIzol® (Life Technologies) e foram transcritos reversamente usando *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems). As reações de RT-PCR usaram GoTaq® qPCR *Master Mix kit* (Promega) com ciclos de 50 °C (1x2 minutos), 95 °C (1x10 minutos), 95 °C (40x15 segundos), 60 °C (40x1 minuto), 95 °C (1x15 segundos); 60 °C (1x30 segundos), 95 °C (1x15 segundos). A variação de expressão (*fold change – FC*) foi calculada através da comparação do limiar de ciclo (*comparative cycle threshold*) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Todos os pares de iniciadores (*primers*) usados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Pares de iniciadores (*primers*) desenhados e utilizados nas análises de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR).

Gene-NM	Gene-Primer	Sequencia
RPS29 (NM_001032)	RPS29_RT_F	5' GCACTGCTGAGAGCAAGATG 3'
	RPS29_RT_R	5' ATAGGCAGTGCCAAGGAAGA 3'
RPS13 (NM_001017)	RPS13_RT_F	5' TCTCCTTTTCGTTGCCTGATC 3'
	RPS13_RT_R	5' AATCTGCTCCTTCACGTCG 3'
GAPDH (NM_002046)	GAPDH_RT_F	5' ACATCGCTCAGACACCATG 3'
	GAPDH_RT_R	5' TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG 3'
HPRT1 (NM_000194)	HPRT1_RT_F	5' TGCTGAGGATTTGGAAAGGG 3'
	HPRT1_RT_R	5' ACAGAGGGCTACAATGTGATG 3'
SOD2 (NM_000636)	SOD2_RT_F	5' CCTGGAACCTCACATCAACG 3'
	SOD2_RT_R	5' GCTATCTGGGCTGTAACATCTC 3'
mTOR (NM_004958)	mTOR_RT_F	5' CTGAACTGGAGGCTGATGG 3'
	mTOR_RT_R	5' TGGTCCCCGTTTTCTTATGG 3'
IL1- β (NM_000576)	IL1- β _RT_F	5' GGTACATCAGCACCTCTCAAG 3'
	IL1- β _RT_R	5' CACATTCAGCACAGGACTCTC 3'
MSTN (NM_005259)	MST_RT_F	5' TGATCTTGCTGTAACCTTCCC 3'
	MST_RT_R	5' TCGTGATTCTGTTGAGTGCTC 3'

RESULTADOS

Análise genômica

Todos os dezesseis loci testados confirmaram que os irmãos são gêmeos idênticos [Figura 2].

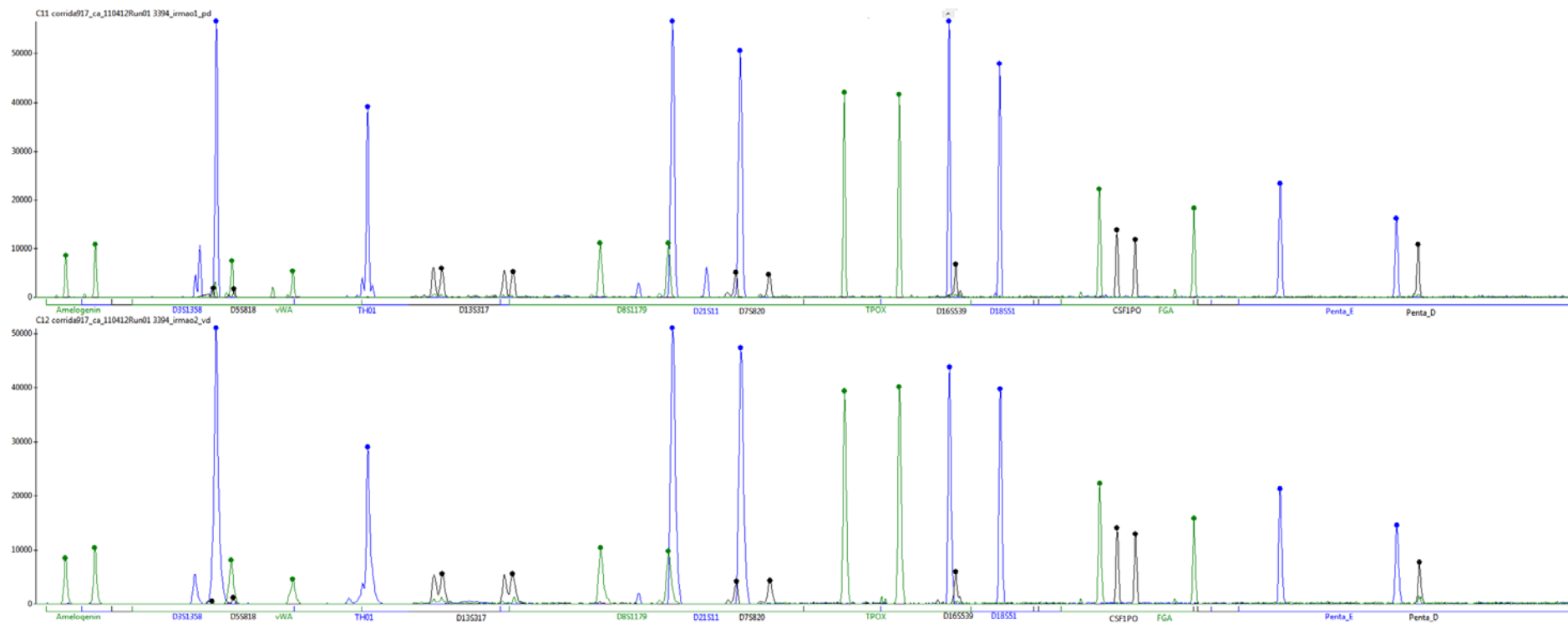


Figura 2. Resultados das análises genômicas para os dezesseis locos testados (Amelogenin, D3S1358, D5S818, vWA, TH01, D13S317, D8S1179, D21S11, D7S820, TPOX, D16S539, D18S51, CSF1PO, FGA, Penta E, Penta D) para os dois irmãos. A imagem superior é do irmão n° 1, e a imagem inferior é do irmão n° 2.

Desempenho muscular

A LEDT diminuiu a fadiga muscular em dinamômetro isocinético (-5%, de 59% para 56%); aumentou a carga no teste de 1RM em *leg press* (+53%, de 320 kg para 490 kg) e também na cadeira extensora (+37%, de 60 kg para 82,5 kg). A LEDT placebo aumentou a fadiga muscular (+15%, de 57% para 66%) e conduziu a menores incrementos de carga no teste de 1RM em *leg press* (+28%, de 320 kg para 410 kg) e na cadeira extensora (+20%, de 62,5 kg para 75 kg) [Figura 3A].

CK e intensidade da dor muscular de início tardio

A LEDT promoveu menores incrementos de CK na 1° (+26%, de 225 UI para 284 UI), 13° (+36%, de 191 UI para 260 UI), 25° (+1%, de 225 UI para 229 UI) e 36° (+7%, de 204 UI para 220 UI) sessões de treinamento comparado à terapia Placebo na 1° (+45%, de 259 UI to 376 UI), 13° (+59%, de 153 UI para 244 UI), 25° (+24%, de 158 UI para 196 UI) e 36° (+23%, de 146 UI para 181 UI) sessões de treinamento. A LEDT diminuiu a intensidade da dor muscular de início tardio em escala visual analógica (VAS) comparada a terapia Placebo na 1° (5,5 *versus* 8,2), 13° (1,4 *versus* 3,2), 25° (0,4 *versus* 1,8) e 36° (0,3 *versus* 1,0) sessões de treinamento [Figura 3A].

Volume muscular

Houve um aumento no volume dos músculos da coxa mensurado por MRI quando a LEDT foi combinada ao programa de treinamento (+20%, de 2.937 cm³ para 3.523 cm³), enquanto a terapia Placebo proporcionou um menor aumento (+5%, de 3.152 cm³ para 3.316 cm³) [Figura 3B].

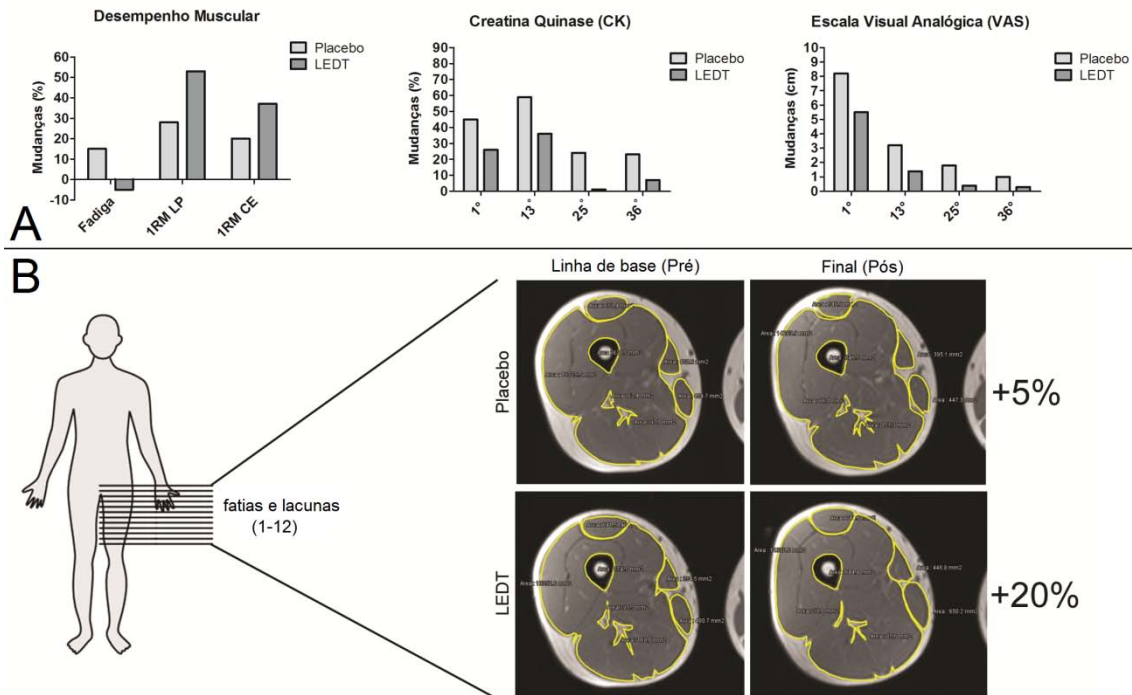


Figura 3. A) Resultados em percentual de mudanças (%) para o desempenho muscular após o programa de treinamento para o teste de uma repetição máxima (1RM) em *leg press* (LP) e cadeira extensora (CE) e teste de fadiga em dinamômetro isocinético; mudanças percentuais de creatina quinase (CK) no sangue relacionadas à primeira (1°), décima terceira (13°), vigésima quinta (25°) e trigésima sexta (36°) sessões de treinamento; mudanças na escala visual analógica (VAS) em centímetros (cm) relacionadas a primeira (1°), décima terceira (13°), vigésima quinta (25°) e trigésima sexta (36°) sessões de treinamento. **B)** Imagens de Ressonância Magnética (MRI) dos músculos da coxa antes (linha de base – pré) e após (final) o programa de treinamento. Doze fatias e lacunas foram utilizadas para calcular o volume muscular. Imagens do nível 5 (fatia n° 5) para ambos os gêmeos estão representando a diferença total entre as terapias levando em consideração todos as 12 fatias e lacunas. Os resultados foram apresentados em percentual de mudanças (%).

Expressão gênica

As sinalizações para a inflamação (IL1- β) e atrofia muscular (MSTN) foram diminuídas com a LEDT (FC= -11,5 e -4,0, respectivamente) comparadas à terapia Placebo (FC= +2,3 e -1,4). Além desses resultados, a sinalização para síntese de proteínas (mTOR) e defesa antioxidante (SOD2) foram aumentadas com a LEDT (FC= +1,4 and +1,4, respectivamente) comparada à terapia Placebo (FC= +1,1 e +1,0) [Figura 4].

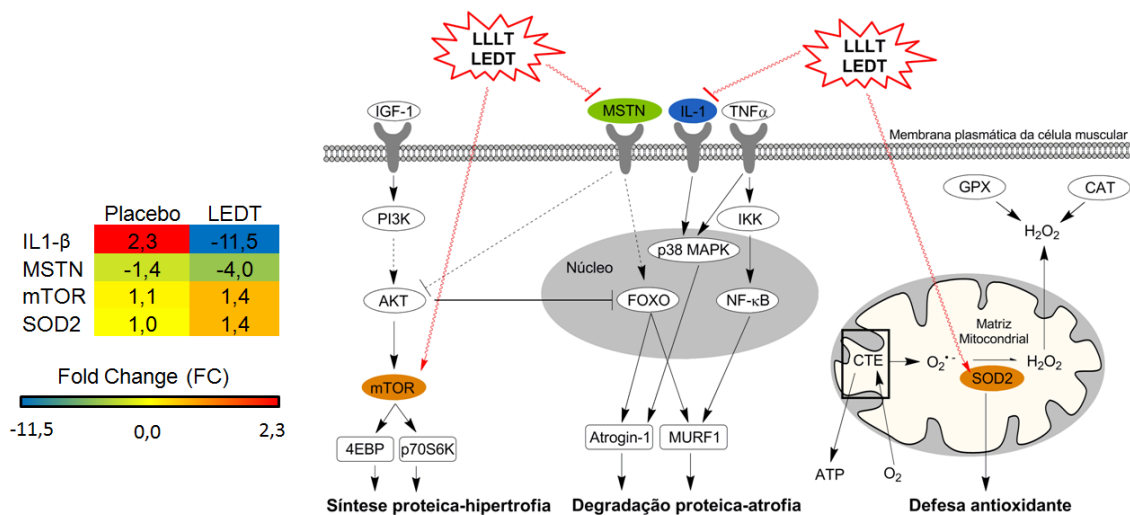


Figura 4. Lado esquerdo da figura representa a variação de expressão gênica (*fold change – FC*) para IL1- β (*interleukin-1- β*), MSTN (*myostatin*), mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) e SOD2 (*superoxide dismutase 2, mitochondrial*). Lado direito da figura é o suposto efeito da fototerapia por lasers (*low-level laser therapy – LLLT*) e LEDs (*light-emitting diode therapy – LEDT*) na sinalização de células musculares em humanos. Genes coloridos foram modulados pela fototerapia. Siglas. CTE= cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

DISCUSSÃO

Lasers são comumente usados na medicina para diferentes tratamentos (HUIKESHOVEN *et al.*, 2007; IBRAHIMI; SAKAMOTO e ANDERSON, 2013) e desde 1960, os lasers de baixa intensidade (até 500 mW) (HUANG *et al.*, 2009) tem promovido com sucesso terapias não invasivas para tratar a dor (CHOW *et al.*, 2009), processos inflamatórios (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2014) e acelerar o reparo tecidual (ENWEMEKA *et al.*, 2004)

Recentemente a fototerapia, incluindo a terapia LED (LEDT), tem sido aplicada sobre os músculos esqueléticos antes ou após os exercícios para acelerar a recuperação muscular, proteger contra o dano muscular induzido pelo exercício físico e melhorar o seu desempenho (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN

e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Os mecanismos de ação da fototerapia sobre os tecidos biológicos estão relacionados a absorção da luz por cromóforos celulares, e nesse contexto, a enzima citocromo c oxidase (Cox) tem sido identificada como a principal proteína que absorve luz (KARU, 1999). A enzima Cox, unidade IV na cadeia respiratória mitocondrial, desencadeia uma série de efeitos secundários após a absorção da luz como aumento na síntese de adenosina trifosfato (ATP) e modulações nas taxas de síntese de DNA e RNA (KARU, 1999).

O nosso estudo envolvendo irmãos gêmeos idênticos é o primeiro estudo nesse campo de pesquisa, e mostrou uma grande redução na expressão gênica de IL1- β que é um marcador de inflamação, e de MSTN que é um marcador de fraqueza e perda de massa muscular (sinalização de atrofia) (SCHUELKE *et al.*, 2004) quando a LEDT foi aplicada após o exercício. Além disso, os genes relacionados à síntese proteica (mTOR) (GLASS, 2003) e defesa ao estresse oxidativo (SOD2) (POWERS e JACKSON, 2008) foram também superexpressos com o uso da LEDT após o exercício. Esses efeitos moleculares sobre a síntese de RNA, associados ao maior aumento de volume muscular (DNA - MRI), desempenho muscular (carga nos testes de 1RM), redução do dano muscular (CK) e intensidade de dor (VAS), sugerem uma fotobiomodulação nas células musculares e tecido muscular em humanos (KARU, 1999; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012) [Figure 4].

As implicações clínicas do nosso estudo apontam para o uso da fototerapia como uma terapia para o ganho de massa muscular e melhora do desempenho (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013) sem o uso de drogas para o aumento de desempenho (HOFFMAN *et al.*, 2009), redução do dano muscular, assim como menor inflamação e dor (CHOW *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem também que a fototerapia pode ter aplicações como

uma terapia alternativa em doenças musculares e distrofias (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2014).

Não há nenhum posicionamento tomado pela agência mundial antidoping (*World Anti-Doping Agency* – WADA) ou pelo comitê olímpico internacional (*International Olympic Committee* – IOC) considerando o uso da fototerapia para o aumento de desempenho muscular. No entanto, várias drogas, métodos e estratégias para modular a expressão gênica têm sido proibidos, caracterizando-se como “doping genético” (MIAH, 2004). É possível que os nossos resultados levantem muitas preocupações sobre se a fototerapia deve ser permitida em competições, e se não for, como seria possível detectar se essa terapia foi usada em atletas. A detecção do uso da fototerapia seria um grande desafio, considerando que, para nosso conhecimento, não há nenhum método, até o momento, capaz de realizar essa tarefa.

CONCLUSÃO

Esse é o primeiro estudo a relatar os efeitos da fototerapia usando um arranjo de LEDs sobre um treinamento de força e sobre o tecido muscular em humanos com as mesmas características genéticas (gêmeos idênticos). Além disso, nossos resultados de expressão gênica sugerem uma base molecular para o aumento de desempenho muscular, aumento do volume muscular e redução da intensidade da dor muscular de início tardio quando a LEDT é combinada com exercícios de força. Esse estudo sugere que a fototerapia pode ser usada para aumentar o desempenho de atletas e de quem pratica esportes de alto rendimento, mas os nossos dados podem levantar preocupações se a fototerapia deve ser permitida, ou não, em competições.

**Terapia LED (*light-emitting diode therapy - LEDT*) antes dos jogos
previne incrementos de creatina quinase (CK) com dose-resposta em
atletas de voleibol: estudo randomizado e duplo-cego controlado por
placebo**

Artigo submetido ao periódico *Lasers in Medical Science*
(ANEXO VI)

RESUMO

A fototerapia de baixa intensidade tem sido aplicada sobre os músculos esqueléticos antes de exercício intenso (pré-condicionamento muscular) com o objetivo de reduzir a fadiga e o dano muscular (mensurado por creatina quinase – CK) em estudos clínicos. No entanto, os protocolos de exercícios utilizados até o momento não simulam a real demanda muscular exigida nos esportes. Por essa razão, o objetivo desse estudo foi investigar se a terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT) aplicada sobre os músculos do quadríceps femoral, isquiotibiais e tríceps sural de atletas de voleibol antes de jogos oficiais poderia prevenir o dano muscular (CK). Um time profissional de voleibol (12 atletas) fez parte desse estudo e a LEDT foi aplicada antes de 4 jogos oficiais durante a liga nacional de voleibol (Superliga). A LEDT usou um arranjo flexível de 200 LEDs, dispostos em 25 arranjos de 4 LEDs infravermelhos (850 ± 20 nm; 130 mW) e 25 arranjos de 4 LEDs vermelhos (630 ± 10 nm; 80 mW). Os atletas foram randomizados para receberem 4 diferentes doses totais de luz sobre cada grupo muscular em protocolo duplo-cego: 105 J (20 seg); 210 J (40 seg); 315 J (60 seg) e Placebo (nenhuma luz durante 30 seg). A CK no sangue foi avaliada 1 hora antes e 24 horas após cada jogo. A LEDT com dose de 210 J evitou significantes aumentos na CK (+10%; $P = 0,993$), assim como 315 J (+31%, $P = 0,407$). A terapia Placebo (0 J) permitiu significantes aumentos de CK (+53%; $P = 0,012$), assim como a LEDT com dose de 65 J (+59%; $P = 0,001$). A LEDT preveniu aumentos significantes de CK no sangue de atletas durante jogos oficiais com uma dose-resposta de luz, sugerindo que atletas podem considerar aplicar a LEDT (210-315 J) antes das competições.

Palavras-chave: *light-emitting diode therapy*, fotobiomodulação, LLLT, CK, dano muscular, desempenho muscular

INTRODUÇÃO

Os benefícios da fototerapia de baixa intensidade têm sido investigados ao longo de vários anos no tratamento da dor (ENWEMEKA *et al.*, 2004; CHOW *et al.*, 2009), tendinopatias (TUMILTY *et al.*, 2010) e promoção do reparo tecidual (ENWEMEKA *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2012). O mecanismo de interação entre luz-tecido parece envolver a citocromo c oxidase (Cox) como o principal cromóforo dentro das células, sendo capaz de absorver comprimentos de onda específicos de luz (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010). A Cox é uma enzima mitocondrial com uma função muito importante na cadeia transportadora de elétrons e conseqüentemente promove a respiração celular e produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Por esses motivos, a fototerapia tem sido amplamente usada para muitos tipos de tratamentos médicos, especialmente aquelas indicações que necessitam da estimulação de células e melhora de cicatrização.

Recentemente a fototerapia tem sido usada para aumentar o desempenho muscular (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Quando aplicada após os exercícios, a fototerapia promoveu redução da fadiga (VIEIRA *et al.*, 2012) e aumentou a carga de trabalho em testes de esforço máximo (FERRARESI *et al.*, 2011) após programas de treinamento. Quando aplicada antes dos exercícios (pré-condicionamento muscular), a fototerapia aumentou o número de repetições e foi capaz de promover uma “proteção muscular” contra o dano induzido pelo exercício (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013) mensurado pela diminuição dos níveis de creatina quinase (CK) no sangue.

A fim de investigar os efeitos da fototerapia sobre a “proteção muscular” contra o dano induzido pelo exercício, diferentes protocolos de exercício ou estimulação

elétrica neuromuscular foram usados para induzir fadiga e o dano muscular em modelos experimentais (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; SUSSAI *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2014) e em estudos clínicos (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009a; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c; BARONI *et al.*, 2010a; BARONI *et al.*, 2010b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2011; FELISMINO *et al.*, 2014). Esses estudos avaliaram diferentes comprimentos de onda e diferentes fontes emissoras de luz, como diodos de lasers (*low-level lasers*) e LEDs (*light-emitting diodes*) (ANTONIALLI *et al.*, 2014). Três estudos recentes (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013) relataram resultados muito interessantes e apontam para a eficácia do pré-condicionamento muscular usando diodos de lasers e LEDs para prevenir a fadiga e o dano muscular (CK) quando aplicados antes (5 minutos) de uma sessão de exercício.

Tendo em mente todos os resultados prévios sobre pré-condicionamento muscular usando a fototerapia (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013), o presente estudo teve como objetivo investigar a efetividade da fototerapia usando LEDs (terapia LED – LEDT) na prevenção do dano muscular (CK) em atletas profissionais de voleibol durante um campeonato nacional. Esse estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo usou um arranjo flexível de LEDs para irradiar igualmente todos os grupos musculares alvo (FERRARESI *et al.*, 2011) com diferentes doses de luz a fim de estabelecer também uma janela terapêutica ou dose-resposta (HUANG *et al.*, 2009) transportando, assim, os estudos prévios para a prática clínica. Além disso, o arranjo de LEDs emitiu luz na faixa do vermelho e infravermelho ao mesmo tempo baseando-se em estudos que reportaram melhor absorção da luz pela Cox usando comprimentos de

onda nas regiões espectrais do vermelho e infravermelho próximo (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010). O possível tempo-resposta de 5 minutos, amplamente relatado no pré-condicionamento muscular (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013) foi modificado para 40-60 minutos, uma vez que estudos prévios já relataram um intervalo de 3-45 minutos para a fototerapia aumentar a síntese de ATP em células (PASSARELLA *et al.*, 1984; KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995); e também tornar possível a realização do pré-condicionamento muscular para todos os atletas antes de cada jogo oficial de voleibol.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo e declaração de ética

O presente estudo foi randomizado, duplo-cego e controlado por placebo envolvendo um time profissional de jogadores de voleibol na “Superliga” (campeonato nacional) no Brasil durante 4 jogos oficiais. Cada jogo foi realizado em diferentes estádios, de acordo com a programação do campeonato. Todos os pesquisadores viajaram com a comissão técnica e os atletas durante o estudo. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos da Universidade Federal de São Carlos (número de protocolo 217/2012 – *Apêndice III*).

Voluntários

Doze atletas profissionais de voleibol (todo o time) foram inscritos nesse estudo. Eles tiveram uma média de idade de $25,5 \pm 5,3$ anos, massa corporal de $90,6 \pm 7,3$ kg e altura de $200 \pm 8,7$ cm. Após a inclusão dos atletas no estudo, todos assinaram um

termo de consentimento livre e esclarecido. No entanto, durante o curso do estudo, dois atletas sofreram lesões musculoesqueléticas e então foram excluídos.

Crítérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram: atletas profissionais de voleibol saudáveis. Os critérios de exclusão usados foram: jogadores de voleibol com alguma lesão musculoesquelética antes do início do estudo ou lesionados durante o curso do estudo.

Grupos e procedimentos de randomização

Todos os atletas foram randomicamente alocados em quatro diferentes grupos de pré-condicionamento muscular, de acordo com a dose de luz (Joules – J) da terapia LED (LEDT) aplicada:

- Dose 1: 20 segundos de LEDT (105 J total) sobre os músculos do quadríceps femoral, isquiotibiais e tríceps sural;
- Dose 2: 40 segundos de LEDT (210 J total) sobre os músculos do quadríceps femoral, isquiotibiais e tríceps sural;
- Dose 3: 60 segundos de LEDT (315 J total) sobre os músculos do quadríceps femoral, isquiotibiais e tríceps sural;
- Dose 4: 30 segundos de LEDT Placebo (0 J total) sobre os músculos do quadríceps femoral, isquiotibiais e tríceps sural.

Cada atleta recebeu randomicamente uma das doses de luz antes de cada jogo oficial do campeonato. O procedimento de randomização foi conduzido no *Randomization.com* (<http://www.randomization.com>) usando permutações balanceadas

em 1 bloco com 4 diferentes terapias: dose 1 a dose 4. O procedimento de randomização foi realizado pelo avaliador n° 1, o qual operou o equipamento de terapia LED. Esse pesquisador foi instruído a não informar os atletas, demais pesquisadores e comissão técnica sobre a dose de luz aplicada em cada atleta em cada jogo.

Protocolo experimental

Terapia LED (light-emitting diode therapy – LEDT)

A LEDT usou um arranjo flexível de LEDs de 34x18 cm contendo 200 LEDs dispostos em 25 arranjos de 4 LEDs infravermelhos (850 ± 20 nm; 130 mW) e 25 arranjos de 4 LEDs vermelhos (630 ± 10 nm; 80 mW) especialmente construído para pesquisa pela Universidade Federal de São Carlos e pela Universidade de São Paulo, Brasil [Figura 1]. Os tempos de irradiação foram de 20 segundos, ou 40 segundos, ou 60 segundos, ou 30 segundos (Placebo) sobre cada grupo muscular (quadríceps femoral, isquiotibiais, tríceps sural) de cada membro inferior dos atletas com parâmetros fixos descritos na tabela 1. A LEDT ou Placebo foi aplicado entre 40-60 minutos antes de iniciar cada jogo oficial, de acordo com o procedimento de randomização. A LEDT Placebo não emitiu luz (0 J e 0 mW) sobre os grupos musculares. A potência óptica do equipamento foi mensurada utilizando um medidor de energia e potência óptica PM100D Thorlabs® equipado com um sensor S130C (área de $0,70$ cm²). Todos os atletas foram cegados para as terapias, assim como a comissão técnica e o avaliador n° 2 até o fim do estudo. Não houve sensação perceptível de calor na pele para a LEDT ou Placebo.

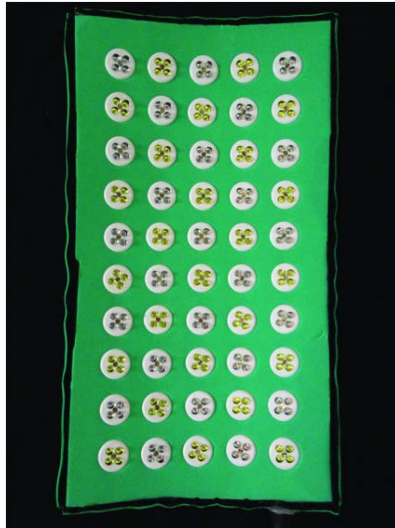


Figura 1. Arranjo de 200 LEDs (*light-emitting diodes*): 100 LEDs emitindo luz infravermelha (850 ± 20 nm) dispostos em 25 arranjos de 4 LEDs (LEDs amarelos) mais 100 LEDs emitindo luz vermelha (630 ± 10 nm) dispostos em 25 arranjos de 4 LEDs (LEDs brancos).

Tabela 1. Parâmetros da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*). Terapia Placebo (30 seg) não emitiu luz (0 J e 0 mW)

Número de LEDs: 200 (100 infravermelho-IR e 100 vermelho-RED)
Comprimento de onda: 850 ± 20 nm (IR) e 630 ± 10 nm (RED)
Número de arranjos: 25 (IR) e 25 (RED)
Frequência: contínuo
Potência óptica (cada arranjo de 4 LEDs): 130 mW (IR) e 80 mW (RED)
Potência óptica total: 5.250 mW (25 x 130 mW mais 25 x 80 mW)
Área de cada LED: $0,2 \text{ cm}^2$
Densidade de potência (cada arranjo): $185,74 \text{ mW/cm}^2$ (IR) e $114,28 \text{ mW/cm}^2$ (RED)
Tempo de tratamento sobre cada grupo muscular: 20 seg, ou 40 seg, ou 60 seg
Energia em cada arranjo em 20 seg: 2,6 J (IR) e 1,6 J (RED)
Energia em cada arranjo em 40 seg: 5,2 J (IR) e 3,2 J (RED)
Energia em cada arranjo em 60 seg: 7,8 J (IR) e 4,8 J (RED)
Densidade de energia em cada arranjo em 20 seg: $3,71 \text{ J/cm}^2$ (IR) e $2,28 \text{ J/cm}^2$ (RED)
Densidade de energia em cada arranjo em 40 seg: $7,42 \text{ J/cm}^2$ (IR) e $4,56 \text{ J/cm}^2$ (RED)
Densidade de energia em cada arranjo em 60 seg: $11,13 \text{ J/cm}^2$ (IR) e $6,84 \text{ J/cm}^2$ (RED)
Energia total entregue a cada grupo muscular em 20 seg: 105 J [2,6 J x 25= 65 J (IR) plus 1,6 x 25= 40 J (RED)]
Energia total entregue a cada grupo muscular em 40 seg: 210 J [5,2 J x 25= 130 J (IR) plus 3,2 x 25= 80 J (RED)]
Energia total entregue a cada grupo muscular em 60 seg: 315 J [7,8 J x 25=

195 J (IR) plus 4,8 x 25= 120 J (RED)]

Energia total aplicada sobre o corpo em 20 seg: 630 J

Energia total aplicada sobre o corpo em 40 seg: 1.260 J

Energia total aplicada sobre o corpo em 60 seg: 1.890 J

Modo de aplicação: contato

Amostras sanguíneas para a análise de creatina quinase (CK)

As amostras sanguíneas para análise da atividade de creatina quinase (CK) foram coletadas do lóbulo da orelha usando lancetas esterilizadas 1 hora antes e 24 horas após cada jogo oficial. O local da punção realizada com a lanceta foi esterilizado com álcool, seco e a primeira gota de sangue foi descartada. O sangue coletado (3µl) foi imediatamente analisado em Reflotron Plus[®] *biochemical analyzer* (Roche, DEU) (HORNERY *et al.*, 2007) seguindo o manual de instruções do fabricante. Essa análise foi conduzida pelo avaliador n° 2 e todos os resultados foram cegados para o avaliador n° 1, comissão técnica e todos os atletas até o final do estudo.

Jogos

O tempo de cada jogo foi monitorado pelo avaliador n° 3 (comissão técnica), bem como os seis jogadores titulares da equipe (jogadores que não estavam na reserva) em cada jogo.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os dados dos seis jogadores titulares (jogadores não reservas) em cada jogo oficial. O teste de Shapiro Wilk's W verificou a normalidade da distribuição dos dados. A atividade da creatina quinase foi comparada

entre os grupos por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias (*two-way*) com medidas repetidas e *post hoc* de Tukey HSD. O nível de significância foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Jogos

A média de tempo de cada jogo foi de 133.75 ± 8.99 minutos.

Atividade de creatina quinase (CK)

A LEDT dose 1 (20 seg, 105 J) permitiu aumentos significativos de CK no sangue (de $328,0 \pm 188,9$ U/l para $499,6 \pm 232,0$ U/l; $P = 0,001$). Dose 4 (30 seg – Placebo, 0 J) também permitiu aumentos significativos de CK (de $270,3 \pm 112,4$ U/l para $406,1 \pm 150,5$ U/l; $P = 0,012$). No entanto, a LEDT dose 2 (40 seg, 210 J) evitou um aumento significativo de CK (de $338,8 \pm 130,3$ U/l para $364,1 \pm 127,5$ U/l; $P = 0,993$). A LEDT dose 3 (60 seg) também evitou um aumento significativo de CK (de $245,1 \pm 126,9$ U/l para $318,0 \pm 153,5$ U/l; $P = 0,407$). Esses resultados foram mensurados em todos os seis jogadores titulares de cada jogo e apresentados em percentual de mudança na figura 2.

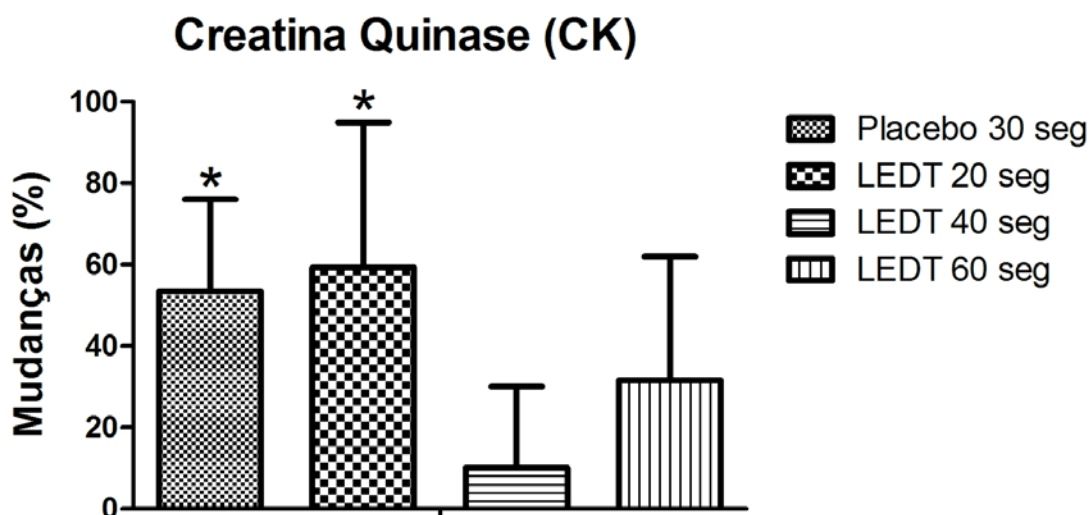


Figura 2. Percentuais de mudança (%) da atividade da creatina quinase (CK) no sangue entre os grupos. Siglas: Terapia LED= *light-emitting diode therapy* – LEDT; * significância estatística ($P < 0,05$) em análise de variância (ANOVA) de duas vias (*two-way*) com medidas repetidas e *post hoc* de Tukey HSD.

DISCUSSÃO

Esse estudo investigou a dose-resposta para a fototerapia usando LEDs (terapia LED – LEDT) na prevenção de aumentos significativos da atividade de creatina quinase (CK) no sangue de atletas de voleibol durante jogos oficiais, estabelecendo uma janela terapêutica (dose-resposta de diferentes doses de luz). Nós aplicamos a LEDT sobre os membros inferiores com o objetivo de cobrir os maiores grupos musculares envolvidos nos movimentos de salto e aterrissagem necessários durante um jogo de voleibol. Além disso, o arranjo de LEDs usado nesse estudo cobriu todos os grupos musculares como recomendado pelo nosso grupo de pesquisa anteriormente (FERRARESI *et al.*, 2011). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que aplicou a LEDT sobre os músculos de atletas profissionais antes de jogos oficiais para a prevenção de dano muscular.

Os efeitos da fototerapia de baixa intensidade quando aplicada sobre o tecido muscular antes de exercícios intensos, são relacionados à prevenção do dano muscular

induzido pelo exercício, promovendo uma rápida recuperação muscular e também produzindo aumentos de desempenho (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). O uso da fototerapia na prevenção de dano muscular tem sido amplamente investigado em estudos experimentais (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; SUSSAI *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2014) e clínicos (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009a; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c; BARONI *et al.*, 2010a; BARONI *et al.*, 2010b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b; LEAL JUNIOR *et al.*, 2011; FELISMINO *et al.*, 2014). Os estudos experimentais têm usado modelos animais para induzirem dano muscular e os estudos clínicos têm usado protocolos de exercícios em dinamômetros isocinéticos, equipamentos de musculação ou o levantamento de pesos livres para induzirem o dano muscular. No entanto, todos esses estudos não puderam simular exatamente a demanda muscular real em atletas durante jogos oficiais de qualquer esporte, motivando o nosso grupo de pesquisa a investigar a efetividade da LEDT em atletas de voleibol usando um regime de pré-condicionamento muscular para prevenir aumentos de CK.

Estudos prévios já reportaram os benefícios da fototerapia usando lasers (*low-level lasers*) e LEDs (*light-emitting diodes*) na prevenção de aumentos de CK (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Para o nosso conhecimento, o primeiro estudo que usou a fototerapia por lasers (LLLT) foi conduzido por LOPES-MARTINS *et al.* (2006) em modelo animal. Esses autores investigaram os efeitos de diferentes doses de luz (0,5; 1,0 e 2,5 J/cm²) no pré-condicionamento muscular para prevenir a fadiga e o dano muscular (CK) induzido pela estimulação elétrica neuromuscular. Esses autores demonstraram uma dose-resposta para a LLLT diminuir a CK no tecido muscular. Em

outro estudo experimental, os autores treinaram ratos sobre uma esteira inclinada e mensuraram a inibição da inflamação, redução de CK e redução do estresse oxidativo (malondialdeído – MDA). Eles também encontraram aumentos na defesa contra o estresse oxidativo (aumento da atividade da superóxido dismutase – SOD) 24 horas e 48 horas após o exercício (LIU *et al.*, 2009). Esses estudos foram importantes para demonstrarem os benefícios da fototerapia sobre o dano muscular induzido pelo exercício, inflamação e estresse oxidativo.

Foram conduzidos mais estudos em modelos experimentais para se investigar os efeitos da fototerapia sobre a CK (LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; SUSSAI *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2014). Usando um modelo de estimulação elétrica neuromuscular similar ao publicado previamente (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006), outros autores também encontraram dose-respostas para o pré-condicionamento muscular usando a fototerapia para reduzir a atividade da CK no sangue (LEAL JUNIOR *et al.*, 2010a; DE ALMEIDA *et al.*, 2011), incluindo avaliações de diferentes comprimentos de onda (SANTOS *et al.*, 2014). Outro estudo observou uma redução de CK quando a fototerapia foi aplicada em modelo de natação com carga em ratos (SUSSAI *et al.*, 2010). Recentemente, a fototerapia usando a LEDT tem demonstrado benefícios similares na diminuição de CK quando aplicada após os exercícios (CAMARGO *et al.*, 2012) ou durante os períodos de intervalos entre sessões de atividade física (DA COSTA SANTOS *et al.*, 2014). Todos esses estudos avaliaram a atividade da CK no sangue após 24 horas ou durante um intervalo de tempo de 24-48 horas após o exercício.

Os estudos supracitados criaram a base científica para o uso da fototerapia, incluindo a LEDT, para os futuros estudos clínicos que tiveram como objetivo prevenir o dano muscular induzido pelo exercício avaliando a atividade da CK no sangue.

Recentemente esse efeito de “proteção muscular” promovido pela fototerapia tem sido observado em humanos, usando diferentes protocolos de exercícios para os membros superiores e inferiores (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Esses estudos relataram menores aumentos da atividade de CK no sangue quando a fototerapia foi aplicada antes de exercícios intensos. As doses de luz (Joules – J) usadas nesses estudos estão entre 1 J e 6 J aplicados por diodos de laser, totalizando 4 J (FELISMINO *et al.*, 2014) ou 60 J (LEAL JUNIOR *et al.*, 2010b) sobre o bíceps braquial; 30 J e 40 J (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009b) ou 180 J (BARONI *et al.*, 2010a) sobre o quadríceps femoral. Quando a fonte emissora de luz foi LEDs, esses estudos usaram um cluster de 69 LEDs e aplicaram 0,3 J ou 0,9 J por LED, totalizando 41,7 J por local de irradiação e uma dose total de 41,7 J aplicados sobre o bíceps braquial (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c); 83,4 J (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009a) ou 125,1 J (BARONI *et al.*, 2010b) ou 208,5 J (LEAL JUNIOR *et al.*, 2011) aplicados sobre o quadríceps femoral.

Os nossos resultados estão de acordo com a dose total usada em estudos prévios que usaram a LEDT, ou combinaram LEDs e lasers super-pulsados (ANTONIALLI *et al.*, 2014) para prevenir aumentos de CK no sangue após exercícios para o quadríceps femoral. As nossas doses totais de LEDT mais efetivas foram 210 J (130 J + 80 J de luz infravermelha e vermelha, respectivamente – 40 segundos de irradiação) e 315 J (195 J + 120 J de luz infravermelha e vermelha, respectivamente – 60 segundos de irradiação). A dose total de 105 J (65 J + 40 J de luz infravermelha e vermelha, respectivamente – 20 segundos de irradiação) e LEDT placebo permitiram aumentos significativos de CK, indicando potencial dano muscular a falha da LEDT em promover a “proteção muscular”. Além disso, nós escolhemos usar dois comprimentos de onda (vermelho e infravermelho próximo) baseado-se nas específicas bandas de absorção de luz pela

citocromo c oxidase (Cox) (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010) que é o principal cromóforo nas células. Além disso, os nossos resultados foram observados usando um pré-condicionamento muscular aplicado 40-60 minutos antes de iniciar cada jogo oficial. Essa consideração é importante porque o tempo de espera para iniciar a atividade física pode permitir uma melhor resposta dos músculos à luz, e poderia mudar o paradigma aceito que se refere ao pré-condicionamento muscular usando fototerapia aplicada sobre os músculos 5 minutos antes do exercício para a prevenção de dano muscular induzido por exercício.

As melhores doses de luz emitidas pelos arranjos de 4 LEDs foram entre 5,2 J e 7,8 J para o infravermelho, e entre 3,2 e 4,8 J para o vermelho. Essas doses de luz são similares às doses de luz emitidas por diodos de laser em estudos prévios (BARONI *et al.*, 2010a), reforçando a ideia de que luz é luz (ENWEMEKA, 2005) e não há grandes diferenças entre essas fontes de luz na prevenção do dano muscular induzido pelo exercício se a dose total de luz for adequada. No entanto, é importante destacar que a dose de luz usada para prevenir o dano muscular por meio de pré-condicionamento muscular usando LEDT pode não ser a mesma dose de luz necessária se for aplicada após os exercícios (DOS REIS *et al.*, 2014). É aceito que células sob estresse bioquímico ou mecânico respondem melhor à luz (KARU, 2013) comparadas às células em homeostase.

O número de saltos e aterrissagens ou quaisquer outros movimentos realizados por cada atleta durante cada jogo não foram iguais e não puderam ser padronizados entre os seis atletas titulares em cada um dos jogos. Isso pode ser entendido como uma limitação, mas o decurso de cada jogo foi imprevisível e não pôde ser padronizado.

Finalmente, o presente estudo não foi desenhado para elucidar mecanismos de ação da LEDT quando usada em pré-condicionamento muscular para prevenir o dano induzido pelo exercício. No entanto, estudos prévios já relataram melhor defesa contra o estresse oxidativo (LIU *et al.*, 2009) se a fototerapia por laser for aplicada sobre os músculos após exercícios intensos, bem como antes dos exercícios em estudos clínicos (DE MARCHI *et al.*, 2012). Como relatado anteriormente, o principal cromóforo, ou proteína sensível à luz vermelha/ infravermelha, presente nos tecidos biológicos é a Cox (KARU, 1999). Após a absorção da luz, o metabolismo mitocondrial é modulado, promovendo aumentos na síntese de ATP com uma das reações secundárias (KARU, 1999). Nós sugerimos que a “proteção muscular”, pela fototerapia, contra o dano muscular induzido pelo exercício é também uma resposta secundária, mas a conexão entre a absorção de luz e esse efeito não está totalmente compreendido. Como sugestão para estudos futuros, nós acreditamos que a fototerapia poderia possivelmente modular as proteínas de canais de membrana celular, e/ou proteínas envolvidas na transdução do estresse mecânico gerado durante a contração muscular envolvendo a matriz extracelular e citoesqueleto. Essas modulações poderiam melhorar o ambiente bioquímico e a resposta mecânica das células ao exercício por meio da estabilização da membrana celular.

É importante destacar que não há nenhum posicionamento da Agência Mundial antidoping (*World Anti-Doping Agency – WADA*) ou do Comitê Olímpico Internacional (*International Olympic Committee – IOC*) considerando o uso da fototerapia para a melhora de desempenho muscular. No entanto, se o uso dessa terapia antes dos exercícios se tornar amplamente difundido, nós acreditamos que serão necessárias discussões para definir se a fototerapia constitui-se em vantagem injusta ou não.

CONCLUSÃO

O uso da LEDT na faixa do vermelho e infravermelho próximo no pré-condicionamento muscular foi benéfico para a prevenção de dano muscular em atletas de voleibol durante jogos oficiais. Houve uma dose-resposta para esse efeito com uma melhor dose de luz de 210 J (130 J + 80 J de luz infravermelha e vermelha, respectivamente – 40 segundos de irradiação) e 315 J (195 J + 120 J de luz infravermelha e vermelha, respectivamente – 60 segundos de irradiação) aplicada sobre os músculos dos membros inferiores, comparada a LEDT placebo (0 J) e LEDT 105 J (65 J + 40 J de luz infravermelha e vermelha, respectivamente – 20 segundos de irradiação). Os nossos resultados podem estimular mais pesquisadores e equipes de esportes de alto rendimento a usarem a LEDT para a prevenção de dano muscular em atletas profissionais.

Pré-condicionamento muscular usando terapia LED (*light-emitting diode therapy - LEDT*) para exercício de alta intensidade: estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo com um maratonista de elite

Artigo aceito para publicação no periódico *Physiotherapy Theory and Practice*

(ANEXO VII)

RESUMO

Recentemente a fototerapia de baixa intensidade usando lasers (*low-level laser therapy* – *LLLT*) e LEDs (*light-emitting diode therapy* – *LEDT*) tem sido utilizada para melhorar o desempenho muscular. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia da LEDT na faixa do infravermelho próximo e seus mecanismos de ação para a melhora do desempenho muscular. A cinética do consumo de oxigênio (VO_2), marcadores do dano muscular (creatina quinase – CK e alanina) e fadiga (lactato) foram analisados no sangue e na urina. Também, outros parâmetros metabólicos foram analisados na urina por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H NMR). Um arranjo de 50 LEDs ($\lambda = 850$ nm; 50 mW; 15 segundos; 37,5 J) foi utilizado para irradiar os músculos dos membros inferiores, braços e tronco de um maratonista de elite 5 minutos antes de iniciar os exercícios de alta intensidade com carga constante, realizado em esteira ergométrica. O atleta recebeu ou LEDT-1-Placebo ou LEDT-2-Placebo ou LEDT-Efetivo em estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo com período de intervalo de 7 dias entre cada uma das intervenções. A LEDT melhorou a velocidade do ajuste do consumo de oxigênio muscular (~ -9 segundos), diminuiu o déficit de oxigênio (~ -10 litros), aumentou o consumo de oxigênio na fase do surgimento do componente lento ($\sim +348$ ml.min $^{-1}$) e aumentou o tempo limite de exercício ($\sim +589$ segundos). Além desses resultados, a LEDT diminuiu a concentração de marcadores de dano muscular e fadiga no sangue e na urina (CK, alanina e lactato). Os resultados sugerem que um regime de pré-condicionamento muscular usando LEDT antes de exercícios de alta intensidade poderia modular o metabolismo e a função renal para se alcançar um melhor desempenho muscular.

Palavras-chave: LEDT, LLLT, fotobiomodulação, NMR, consumo de oxigênio, dano muscular, fadiga

INTRODUÇÃO

A fototerapia baseada em laser (ou luz) de baixa intensidade, também conhecida como fotobiomodulação, é conhecida desde 1967 e usa a luz no espectro visível ou infravermelho próximo para promover a cicatrização de tecidos, reduzir dor e inflamação (ENWEMEKA *et al.*, 2004; CHOW *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011). A fototerapia pode ser emitida por diferentes fontes de luz como os diodos de laser e os LEDs (*light-emitting diodes*) (HUANG *et al.*, 2011). Essas fontes de luz são diferentes na monocromaticidade e coerência, uma vez que os diodos de laser emitem luz mais coerente, com uma pequena largura de banda espectral e com menor divergência dos feixes de luz comparados a luz emitida por LEDs (HUANG *et al.*, 2009). No entanto, lasers e LEDs podem produzir efeitos semelhantes sobre os tecidos biológicos se a dose de luz entregue/ aplicada estiver de acordo com a possível dose-resposta bifásica previamente reportada (ENWEMEKA, 2005; HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011), uma vez que a interação luz-tecido depende da absorção de luz por específicas estruturas dentro das células, que são conhecidas como cromóforos (KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU e KOLYAKOV, 2005; KARU *et al.*, 2008; KARU, 2010).

Recentemente a fototerapia usando lasers (*low-level laser therapy – LLLT*) e LEDs (*light-emitting diode therapy – LEDT*) tem sido utilizada para promover melhor desempenho muscular quando aplicada sobre os músculos imediatamente antes ou após exercícios de alta intensidade (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). A fototerapia (LLLT e LEDT) pode estimular o metabolismo mitocondrial promovendo um maior fornecimento de energia para as células, especialmente para as células musculares (KARU, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2009; HAYWORTH *et al.*, 2010; FERRARESI;

HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; FERRARESI e PARIZOTTO, 2013). Uma vez que o metabolismo mitocondrial é influenciado pela fototerapia, é esperado que a cinética do consumo de oxigênio (VO_2) possa também ser modulada pela fototerapia, pois as mitocôndrias usam o oxigênio como o aceptor final para os elétrons da cadeia transportadora de elétrons (CTE).

Somente dois estudos até o momento (DE MARCHI *et al.*, 2012; DA SILVA ALVES *et al.*, 2014) investigaram os efeitos agudos da fototerapia no consumo de oxigênio (VO_2). Entretanto, esses estudos foram limitados a irradiarem poucas áreas dos músculos envolvidos durante o exercício proposto. Além disso, esses estudos não avaliaram a cinética do consumo de oxigênio (VO_2), que é um excelente modo de se avaliar a adaptação oxidativa causada pelo estímulo do exercício físico (BARSTOW, 1994). Assim, a análise da cinética do VO_2 pode revelar o quanto é eficiente o processo da entrega do oxigênio (pelo sistema cardiorrespiratório) e a utilização do oxigênio (nas mitocôndrias). Entre os atuais métodos de análises, a modelagem exponencial de dados do consumo de oxigênio (VO_2) parece ser aquela que melhor fornece informações sobre o VO_2 no início do exercício, como velocidade (ou seja, constante de tempo “ τ ”) e a magnitude do estado estável (ou seja, amplitude “ a ”) (BARSTOW; CASABURI e WASSERMAN, 1993; ROSSITER *et al.*, 1999).

Muitos estudos têm reportado os efeitos da fototerapia sobre o desempenho muscular em exercícios de alta intensidade (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013), mas a maioria desses estudos é limitada principalmente a análises de marcadores de fadiga muscular (lactato) e dano muscular (creatina quinase – CK) somente no sangue (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). No entanto, análises metabólicas baseadas em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H NMR) em amostras de urina podem ser mais

específicas e fornecerem informações detalhadas sobre o metabolismo energético (ENEAL *et al.*, 2010; PECHLIVANIS *et al.*, 2010). Além disso, se combinadas, ambas as análises (urina e sangue) podem oferecer uma “equilibrada” análise acerca dos processos de produção e remoção de lactato, bem como de outros metabólitos oriundos da degradação de proteínas, fornecendo uma ideia do grau do dano muscular.

A maioria dos estudos prévios envolvendo fototerapia e desempenho muscular irradiou os músculos com limitado número de pontos de aplicação (BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Mas se a ideia é aumentar o desempenho de todo um grupo muscular, então o número de pontos de aplicação da fototerapia deve cobrir toda a área envolvida no exercício proposto (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; FERRARESI e PARIZOTTO, 2013).

O presente estudo investigou os efeitos agudos da LEDT sobre a oxidação mitocondrial no tecido muscular (através da análise da cinética do consumo de oxigênio – VO₂), marcadores sanguíneos de fadiga e dano muscular associado a análises metabólicas por meio de ¹H NMR em amostras de urina. Foi avaliado o desempenho muscular de um maratonista de elite que recebeu um pré-condicionamento muscular por meio da LEDT antes de realizar exercícios intensos de corrida em esteira ergométrica. Como reportado em estudos prévios, o pré-condicionamento muscular foi aplicado imediatamente antes dos exercícios (DE MARCHI *et al.*, 2012; DA SILVA ALVES *et al.*, 2014), mas o número de pontos de aplicação da fototerapia cobriu todos os grupos musculares recrutados durante o exercício proposto (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; FERRARESI e PARIZOTTO, 2013).

MÉTODOS

Um atleta maratonista de elite; 28 anos; 1,80 m de altura; 63,6 Kg de massa corpórea; 19,6 Kg/m² de índice de massa corpórea; e 4 anos de experiência em competições de corrida de alto nível foi incluído nesse estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo.

O atleta declarou ser saudável e não ter qualquer tipo de disfunção musculoesquelética, neurológica, metabólica, respiratória ou doença cardiovascular. Após serem explicadas todas as propostas e procedimentos do estudo, o atleta assinou um termo de consentimento livre e esclarecido e foi submetido a um protocolo de exercício para mensurar sua capacidade aeróbia, a cinética de VO₂, desempenho muscular e análises metabólicas no sangue e urina. Esse estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (217/2012 – *Apêndice III*) e registrado no Clinical Trials.gov (NCT01770977).

Teste cardiopulmonar [TECP]: identificando a carga de trabalho alvo para o exercício

O TECP foi realizado em esteira ergométrica (Master ATL, Inbramed, Porto Alegre, Brazil) utilizando um protocolo em rampa que consistiu de 5 minutos de aumento incremental na velocidade a partir de 0,8 km.h⁻¹ até 18 km.h⁻¹ seguido de incrementos na inclinação (0,5% a cada 30 segundos). Esse teste foi concluído quando o atleta apresentou sinais e/ou sintomas de máximo esforço ou fadiga. O analisador de gases foi calibrado previamente ao teste seguindo procedimentos padrão (BALADY *et al.*, 2010). Ventilação e parâmetros metabólicos foram monitorados e registrados respiração a respiração (CPX-D/BreezeSuite 6.4.1, Medical Graphics, St Paul, USA). O

eletrocardiograma foi continuamente monitorado (Active, Ecafix, Sao Paulo, Brazil) e a frequência cardíaca (FC) foi registrada por um sistema de telemetria digital (Polar® S810i; Polar Electro Oy, Kempele, Finland). A pressão arterial foi avaliada a cada dois minutos. Usando o método ventilatório, 3 avaliadores independentes determinaram o limiar de anaerobiose ventilatório (LAV) e o ponto de compensação respiratória (PCR). O maior valor médio de VO_2 observado nos últimos 30 segundos de exercício foi considerado como o VO_2 pico. O TECP foi realizado em laboratório apropriado, com umidade entre 35 a 40% e temperatura entre 24 e 25 °C.

Tabela 1: Resultados dos parâmetros funcionais no limiar de anaerobiose ventilatório (LAV) e pico do teste cardiopulmonar (TECP) realizado em esteira ergométrica utilizando protocolo em rampa para determinar a carga de trabalho nos testes de carga constante (TCC)

TECP	LAV	Pico
Tempo (min)	9	17,00
VO_2 (mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	48,6	67,60
VO_2 (L.min ⁻¹)	2,96	4,40
VCO_2 (L.min ⁻¹)	2,54	4,48
FC (bpm)	154	182

Siglas. FC= frequência cardíaca, VO_2 = consumo de oxigênio; VCO_2 = produção de dióxido de carbono.

Teste de carga constante (TCC): correr até a exaustão voluntária

O teste de carga constante (velocidade e inclinação) foi baseado nos valores de VO_2 obtidos no TECP (descrito previamente). Foi utilizada uma carga intensa correspondendo a 95% do VO_2 no ponto de compensação respiratória (PCR) (WHIPP e CASABURI, 1982; WHIPP, 1994). Após 2 minutos de descanso em posição ereta sobre a esteira ergométrica, foi iniciado o TCC com um único ajuste até a carga de trabalho

alvo (18,0 Km/h, 4%) até o atleta apresentar sinais e/ou sintomas de fadiga ao exercício e decidir parar o exercício voluntariamente. O monitoramento e os procedimentos de aquisição da frequência cardíaca, parâmetros ventilatórios e metabólicos foram similares aos utilizados no TECP.

O TCC foi realizado 4 vezes em laboratório apropriado com umidade e temperatura controlados como no TECP. O primeiro TCC foi realizado 2 dias após o TECP apenas para a familiarização do atleta com todos os procedimentos e métodos e, dessa maneira, não foi coletado/ analisado nenhum dado. Após 7 dias, foram realizados 3 TCCs: LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo. Entre cada um dos TCCs, foi dado um intervalo de 7 dias [Figura 1]. O TCEP e todos os TCCs foram realizados sempre no mesmo período do dia (vespertino). A LEDT-Placebo ou LEDT-Efetivo foi aplicada sobre os músculos do atleta de acordo com os procedimentos de randomização.

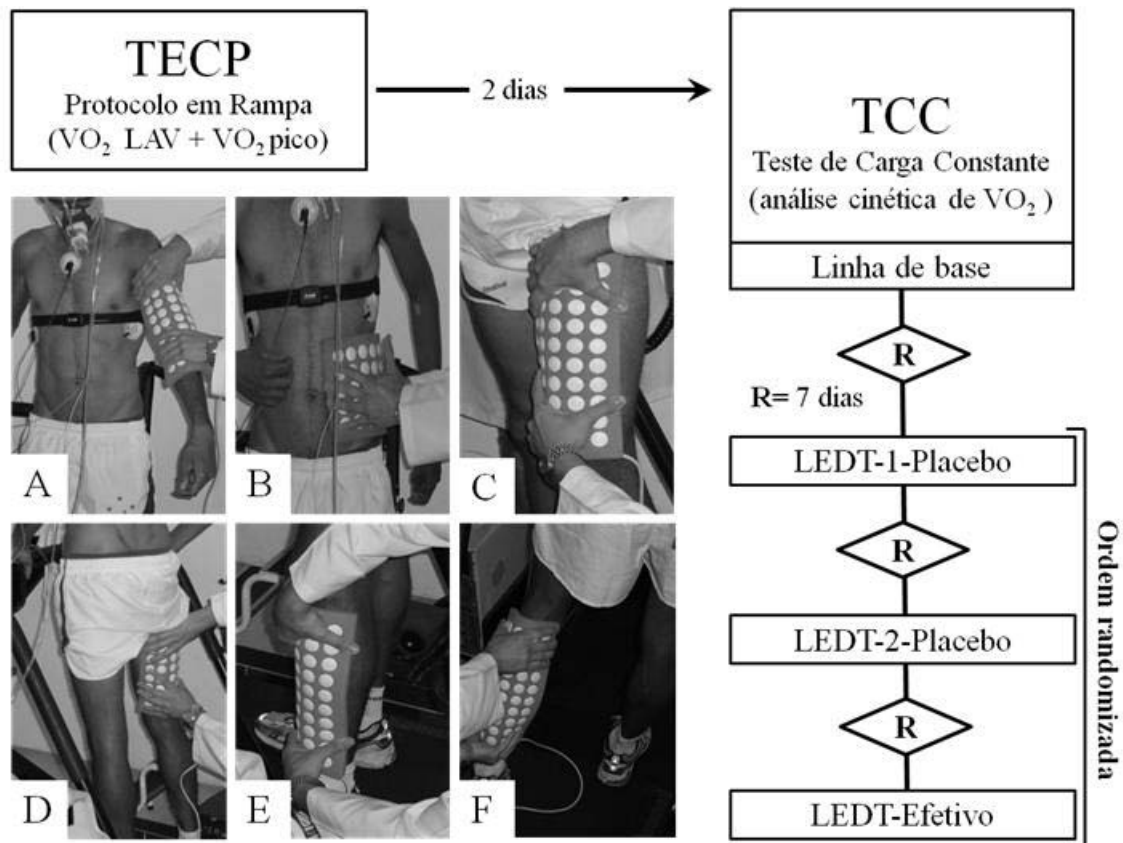


Figura 1. Procedimentos do estudo e grupos musculares irradiados pela LEDT (*light-emitting diode therapy*): A) bíceps braquial e tríceps braquial; B) oblíquo externo e grande dorsal; C) quadríceps femoral; D) isquiotibiais; E) tibial anterior e fibulares; F) gastrocnêmio e sóleo. A ordem de cada terapia (LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo) foi randomizada. A sequência de aplicação da LEDT não foi randomizado e respeitou a seguinte sequência: F, E, D, C, B, A. Siglas. R= intervalo de dias entre os testes de carga constante; LAV= limiar anaeróbio ventilatório.

LEDT (*light-emitting diode therapy*): randomização, cegamento dos procedimentos, terapia placebo e terapia efetiva

A terapia por LEDT no espectro do infravermelho próximo utilizou um arranjo de múltiplos LEDs (850 ± 20 nm) especialmente construído para pesquisa pela Universidade Federal de São Carlos e Universidade de São Paulo [Figura 1]. As características de cada LED e parâmetros da LEDT são apresentados na tabela 2. Todos os parâmetros deste equipamento para a LEDT foram calibrados por meio de medidor

de potência óptica (modelo PM100D e sensor de potência modelo S130C - Thorlabs®). Todos os parâmetros usados na LEDT foram baseados em estudos previamente reportados na literatura correlata (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013).

Tabela 2. Parâmetros da LEDT (*light-emitting diode therapy*) e regiões de aplicação antes da realização de cada um dos testes de carga constante (TCC)

Número de LEDs: 50
Comprimento de onda: 850 nm ± 20 nm
Frequência: contínuo
Potência óptica: 50 mW
Área do LED: 0,2 cm ²
Densidade de potência: 250 mW/cm ²
Tempo de tratamento sobre cada grupo muscular: 15 segundos
Energia por diodo (LED) em 15 segundos: 0,75 J
Densidade de energia por diodo (LED) em 15 segundos: 3,75 J/cm ²
Número de pontos de irradiação por grupo muscular: 50
Energia total entregue a cada grupo muscular: 37,5 J
Grupos musculares irradiados antes de cada TCC: A) bíceps braquial e tríceps braquial; B) oblíquo externo e grande dorsal; C) quadríceps femoral; D) isquiotibiais; E) tibial anterior e fibulares; F) gastrocnêmio e sóleo
Energia total entregue ao corpo: 450 J
Potência total: 2.500 mW
Modo de aplicação: equipamento acoplado em contato com a pele

Sigla: J= Joules

A LEDT (placebo ou efetivo) foi aplicada sobre seis principais grupos musculares (A, B, C, D, E e F) recrutados durante a corrida, como descrito na tabela 2 e ilustrado na figura 1. Todos os grupos musculares receberam a LEDT (placebo ou efetivo) 5 minutos antes de cada teste de carga constante (TCC) de acordo com o procedimento de randomização (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). O procedimento de randomização foi gerado em <http://www.randomization.com> usando uma permutação balanceada em 1 bloco com 3 diferentes tipos de terapias: LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo. Dessa

maneira, o presente estudo obteve a seguinte ordem de aplicação das terapias: LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo [Figura 1]. Tanto o atleta quanto os avaliadores não sabiam se a LEDT era efetiva ou placebo durante a coleta e análise de dados. Um botão que seleciona a função placebo ou efetivo foi construído e escondido no equipamento para garantir a aplicação da LEDT em modo duplo-cego. Esse botão foi selecionado previamente sem o conhecimento dos avaliadores ou do voluntário. Além disso, esse botão foi selecionado para “ligado” (LEDT-Efetivo) ou “desligado” (LEDT-Placebo) por um único avaliador, o qual realizou o procedimento de randomização e aplicação da LEDT e não teve acesso à coleta de dados e análises. Uma vez que a LEDT usada foi infravermelha, ninguém (voluntário e avaliadores) pôde identificar se a LEDT era efetiva ou placebo enquanto a exibição do tempo de terapia transcorria no equipamento.

Análises da cinética do consumo de oxigênio (VO_2): modelagem dos dados

Uma vez que a fase inicial do consumo de oxigênio (VO_2) é principalmente atribuída ao aumento do débito cardíaco e fluxo sanguíneo pulmonar (ARENA *et al.*, 2004), os primeiros 20 segundos de dados registrados foram excluídos das análises da cinética de VO_2 (WHIPP *et al.*, 1982). Após esse procedimento, foi utilizado um modelo bi-exponencial para ajustar os dados de VO_2 para todos os testes de carga constante (TCC):

$$VO_2(t) = a_0 + a_1 \left(1 - e^{\left(\frac{t-TD_1}{\tau_1}\right)}\right) + a_2 \left(1 - e^{\left(\frac{t-TD_2}{\tau_2}\right)}\right)$$

onde “t” é o tempo; “a₀” é o valor médio de VO₂ durante a fase de aquecimento no exercício; “a₁” é a amplitude do VO₂ muscular; “a₂” é a amplitude “extra” de VO₂ na fase de componente lento (a amplitude de VO₂ aumenta nessa fase principalmente pelo recrutamento das fibras musculares do tipo II com baixa eficiência oxidativa (BORRANI *et al.*, 2001)); “τ₁” é a velocidade de ajuste do consumo de oxigênio (VO₂) muscular; “TD₁” é o tempo de atraso para iniciar a fase muscular (ROSSITER *et al.*, 1999) e “TD₂” é o tempo de atraso para surgir a fase de componente lento (surge após alguns minutos de exercício com carga constante acima do limiar anaeróbio ventilatório – LAV) (BARSTOW, 1994; WHIPP, 1994; GAESSER e POOLE, 1996). Também foi calculado o déficit de oxigênio muscular total (O_{2def} = (τ+TD₁) a₁) (WHIPP e CASABURI, 1982).

Análises de lactato e creatina quinase (CK) sanguínea

Para análises dos níveis de lactato, foram coletadas amostras sanguíneas do lóbulo da orelha do atleta por meio de lancetas esterilizadas antes e após 5 minutos do término de cada teste com carga constante (TCC). O local da punção no lóbulo da orelha foi limpo com álcool, seco e a primeira gota descartada. O sangue coletado (25 μL) foi rapidamente transferido para tubos do tipo Eppendorf® contendo 50 μL de fluoreto de sódio (NaF) a 1% e analisado por lactímetro eletroenzimático (YSI 1500 - Yellow Springs, USA) (SIMOES *et al.*, 2013). Lactato foi usado para inferir a fadiga muscular.

A creatina quinase foi analisada a partir de 4,5 mL de sangue coletado da veia antecubital antes e 5 minutos após o término de cada TCC. O sangue foi coletado em tubos heparinizados, centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C e o plasma heparinado foi imediatamente transferido para tubos do tipo Eppendorf® e armazenados em freezer -80°C até ser analisado. As análises de CK foram realizadas em analisador bioquímico Reflotron Plus® (Roche, DEU) (HORNERY *et al.*, 2007) usando 30 µL do plasma heparinado, de acordo com o manual de instruções do equipamento.

Análises metabólicas em urina baseadas em espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (¹H NMR) na urina

Amostras de urina foram coletadas antes e 30 ± 5 minutos após o término de cada TCC placebo ou efetivo (ENEA *et al.*, 2010; PECHLIVANIS *et al.*, 2010). O atleta foi instruído a descartar o primeiro fluxo urinário e urinar cerca de 10 mL dentro de um tubo Falcon. Imediatamente esse tubo foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C até ser analisado. É importante destacar que durante cada dia de teste, o atleta recebeu orientações gerais para ingerir as mesmas quantidades de água e alimentos (ENEA *et al.*, 2010; PECHLIVANIS *et al.*, 2010).

Para as análises em ¹H NMR, as amostras de urina foram descongeladas e 1,0 mL foi centrifugado (10 minutos a 10.000 x g) para eliminar fragmentos celulares e sedimentos. Após esse procedimento, 0,9 mL de urina foi adicionado a 0,1 mL de solução tampão de fosfato em D₂O (1,5 M, pH= 7.00) contendo 2 mM de NaN₃ (azida de sódio) e 0,1% de TSP-d₄ (sódio 3-trimetilsilil [2,2,3,3-²D₄] propionato), e o pH foi ajustado para 7,00 ± 0,01 após 20 minutos de espera com HCl ou NaOH. Por fim, 0,6

mL de urina foi transferida para um tubo de ressonância magnética nuclear (NMR) de 5 milímetros (Enea *et al.*, 2010).

Os espectros de NMR da amostra de urina foram registrados em espectrômetro Bruker AVANCE III a uma frequência de prótons de 600 MHz equipado com uma CryoProbe TCI de 5 milímetros (z-gradient). Foi utilizada também uma sequência de pulsos unidimensionais (1D) NOESY com pré-saturação de água. Os espectros de creatina quinase e alanina (dano muscular); creatinina (metabolismo energético) e glicina, dimetilalanina (DMA) e trimetilalanina N-óxido (TMAO) (disfunção renal) foram qualitativamente e quantitativamente atribuídos usando Chenomx NMR suite 7.5 software, edição de avaliação (Chenomx Inc., Canada) de acordo com a literatura (Wishart *et al.*, 2009).

Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados de forma descritiva, ou seja, em valores absolutos, percentuais e valores normalizados pelo tempo limite de exercício realizado (T_{lim}). Tabelas e gráficos mostram todas as diferenças entre cada teste. Não foi aplicado nenhum teste estatístico, uma vez que esse estudo envolveu apenas um único atleta maratonista de elite.

RESULTADOS

Cinética do consumo de oxigênio (VO_2) e desempenho

Os parâmetros da cinética do consumo de oxigênio mensurados durante cada teste de carga constante (TCC) foram: “ a_0 ”, “ a_1 ”, “ a_2 ”, “ τ_1 ”, “ TD_1 ”, “ TD_2 ”, tempo limite de exercício (T_{lim}) e o déficit de oxigênio (O_{2def}) (ver definições em *Análises da cinética do consumo de oxigênio*).

LEDT-1-Placebo e LEDT-2-Placebo tiveram resultados muito similares como podem ser vistos na figura 2, sugerindo uma resposta muito similar para o mesmo exercício e de acordo com a literatura (FAISAL; BEAVERS e HUGHSON, 2010). Comparando ambas as terapias placebo, LEDT-1-Placebo teve aproximadamente um adicional de $200 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ na amplitude de VO_2 na fase de componente lento (“ a_2 ”) [Figura 2] e LEDT-2-Placebo teve um maior “ T_{lim} ” de exercício (+144 seg ou +17 %), menor “ $O_{2\text{def}}$ ” (-4 L ou -2.8 %) e “ τ_1 ” (a velocidade de ajuste do VO_2 muscular) (-2 seg ou +5.9 % mais rápido).

Por outro lado, LEDT-Efetivo comparado ao LEDT-1-Placebo aumentou o “ T_{lim} ” (+589 seg ou +70 %), diminuiu “ $O_{2\text{def}}$ ” (-12 L ou -8,4 %) e “ τ_1 ” (-10 seg ou +29,4 % mais rápido). Comparado ao LEDT-2-Placebo, LEDT-Efetivo teve um maior “ T_{lim} ” de exercício (+445 seg ou +45 %), menor “ $O_{2\text{def}}$ ” (-8 L ou -5,8 %) e “ τ_1 ” (-8 seg ou 25% mais rápido). Também, LEDT-Efetivo iniciou a fase de componente lento mais precocemente (menor “ TD_2 ”), teve uma adaptação muscular oxidativa mais rápida (menor valor de “ τ ”), maior amplitude de VO_2 muscular (“ a_1 ”) e a maior amplitude “extra” de VO_2 na fase de componente lento (“ a_2 ”) [Figura 2].

LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo apresentaram 839, 983 e 1.428 segundos para o “ T_{lim} ”; 143, 139 e 131 litros para “ $O_{2\text{def}}$ ” e 34, 32 e 24 segundos para “ τ_1 ”, respectivamente [Figura 3A, B e C, respectivamente].

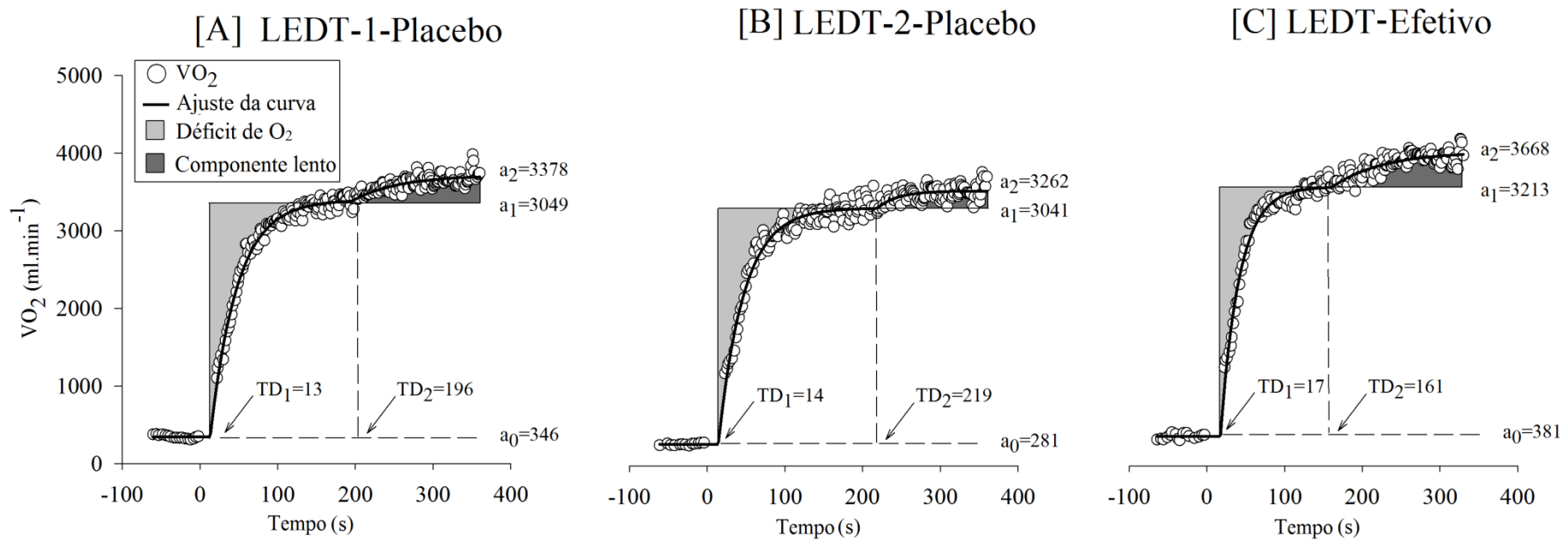


Figura 2. Valores de VO_2 , a_0 , a_1 e a_2 ; TD_1 e TD_2 durante os testes de carga constante (TCC): LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo. **Siglas:** VO_2 (consumo de oxigênio); a_0 (média de VO_2 durante o aquecimento no exercício); a_1 (amplitude de VO_2 muscular na fase muscular); a_2 (amplitude “extra” de VO_2 na fase de componente lento); TD_1 (tempo de atraso para iniciar a fase muscular); TD_2 (tempo de atraso para o início da fase de componente lento); LEDT (*light-emitting diode therapy*).

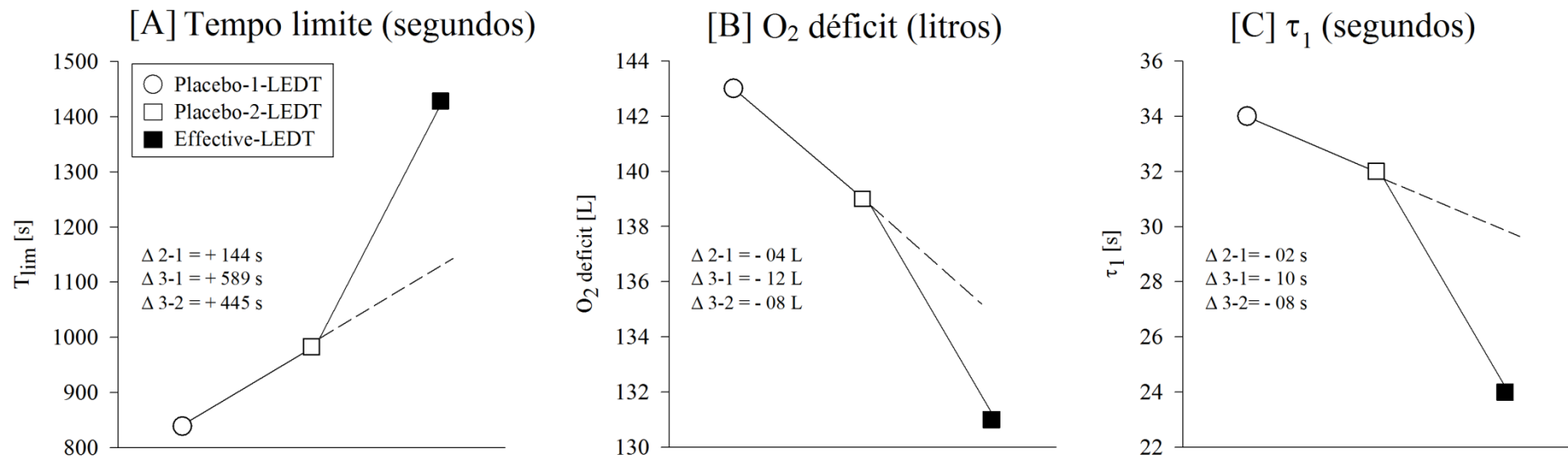


Figura 3. Comparações entre os testes de carga constante (TCC): LEDT-1-Placebo, LEDT-2-Placebo e LEDT-Efetivo. **Símbolos:** T_{lim} (tempo limite de exercício); “ τ_1 ” (velocidade de ajuste do consumo de oxigênio (VO_2) muscular); L (litros); LEDT (*light-emitting diode therapy*). Note nessa figura que foram plotadas linhas pontilhadas para demonstrar a tendência ou linearidade para a adaptação esperada após múltiplos testes de carga constante. No entanto, após a LEDT-Efetivo, houve uma clara quebra de linearidade ou tendência, sugerindo efeitos benéficos da LEDT sobre a cinética de VO_2 .

Análises de sangue e urina

As concentrações de cada metabólito no sangue e/ou urina analisados por ^1H NMR foram expressas em valores absolutos, percentuais de mudança e normalizadas pelo tempo limite de exercício (T_{lim}) de cada teste de carga constante (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados para a creatina quinase (U/L) e lactato no sangue (mmol/L) e análises metabólicas baseadas em ^1H NMR (mM) em urina. Os dados foram expressos em valores de concentração absoluta, percentual de mudança e normalizados pelo tempo limite de exercício realizado (T_{lim})

Concentração	LEDT-1-Placebo				LEDT-2-Placebo				LEDT-Efetivo			
	Pré	Após	$\Delta\%$	$\frac{\Delta\%}{T_{\text{lim}}}$ (839 s) $\times 10^{-2}$	Pré	Após	$\Delta\%$	$\frac{\Delta\%}{T_{\text{lim}}}$ (983 s) $\times 10^{-2}$	Pré	Após	$\Delta\%$	$\frac{\Delta\%}{T_{\text{lim}}}$ (1.428 s) $\times 10^{-2}$
CK (sangue)	105	156	48,57	5,78	113,00	169,00	49,56	5,04	110,00	149,00	35,45	2,48
Lactato (sangue)	1,50	10,20	580	69,12	0,84	9,69	1,053	107,12	1,74	9,60	451,72	31,63
Lactato (urina)	0,32	39,70	12.306	1.466,74	1,20	52,20	4.250	432,34	0,63	41,10	6.423	449,84
Creatinina (urina)	10,80	11,80	9,26	1,10	61,50	70,00	13,82	1,40	20,90	19,70	-5,74	-0,40
Alanina (urina)	0,31	0,54	74,19	8,84	1,59	2,37	49,06	4,98	0,711	1,14	60,34	4,22
Glicina (urina)	0,84	0,81	-3,57	-0,42	3,69	3,22	-12,74	-1,29	1,11	1,37	23,42	1,64
DMA (urina)	0,33	0,39	18,18	2,16	2,05	2,38	16,10	1,63	0,80	0,73	-8,75	-0,61
TMAO (urina)	0,19	0,13	-31,58	-3,76	5,43	4,77	-12,15	-1,23	0,35	0,27	-22,86	-1,60

Siglas: LEDT= *light-emitting diode therapy*; CK= creatine quinase; ^1H NMR= espectroscopia de ressonância magnética nuclear; DMA= dimetilalanina; TMAO= trimetilalanina *N*-óxido; mM= milimolar; $\Delta\%$ = delta em percentual, T_{lim} (tempo limite de exercício).

DISCUSSÃO

Esse estudo preliminar investigou os efeitos do pré-condicionamento muscular usando a LEDT sobre a cinética do consumo de oxigênio (VO_2) e mudanças metabólicas no sangue e urina de um atleta maratonista de elite em testes de exercício do tipo corrida de alta intensidade em esteira ergométrica. Muitos estudos têm utilizado a fototerapia na faixa do infravermelho próximo para aumentar o desempenho muscular (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Os principais efeitos reportados por esses estudos são: diminuição da fadiga (menores níveis de lactato) e dano muscular (menores concentrações de creatina quinase - CK); aumento de torque, carga de trabalho, capacidade aeróbia, defesas antioxidantes e melhor microcirculação quando essa terapia é aplicada sobre o tecido muscular (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c; FERRARESI *et al.*, 2011; DE MARCHI *et al.*, 2012; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; DA SILVA ALVES *et al.*, 2014).

No entanto, ainda não há um consenso sobre como todos os parâmetros da fototerapia, como por exemplo, o comprimento de onda, tempo de terapia, energia, densidade de energia, potência e número de pontos de aplicação devem ser utilizados para proporcionar um melhor desempenho muscular nos exercícios. Assim, baseado na possível dose-resposta bifásica previamente reportada na literatura (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011), o presente estudo aplicou uma energia total por grupo muscular (37,5 Joules) similar à reportada na literatura. Nós usamos 50 pontos de irradiação a fim de cobrir toda a área de cada grupo muscular recrutado no exercício proposto e uma potência óptica (50 mW) (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012), a metade do tempo de

tratamento utilizado previamente (15 segundos) (DE MARCHI *et al.*, 2012) e o comprimento de onda (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c) já descrito na literatura.

Cinética do VO₂ e desempenho muscular

As linhas pontilhadas na figura 3 demonstraram a oscilação esperada ou uma progressiva adaptação entre cada teste de carga constante (mesmo que não mostrada na literatura) (FAISAL; BEAVERS e HUGHSON, 2010). É importante observar que em cada uma dessas linhas há uma abrupta quebra na linearidade (ou uma tendência para uma quebra) após a terapia por LEDT-Efetivo [Figura 3]. Esses resultados preliminares podem sugerir um acelerado (aqui avaliado por “ τ_1 ”) e mais eficiente síntese de adenosina trifosfato (ATP) a partir do metabolismo aeróbio (oxidação fosforilativa) e metabolismo anaeróbio (sistema de Cr-P) principalmente nas fibras de contração lenta antes do surgimento da fase de componente lento (HEPPLE, 2002). Além disso, nossos resultados sugerem uma maior influência da síntese de ATP aeróbio nas fibras de contração rápida (glicolítica e oxidativa) durante a fase de componente lento (JONES *et al.*, 2011) que provavelmente produziu um “ T_{lim} ” de exercício estendido quando comparado às terapias placebo (LEDT-Placebo).

Durante a fase de componente lento há um progressivo aumento na concentração de lactato sanguíneo devido ao progressivo recrutamento das fibras de contração rápida (BORRANI *et al.*, 2001) que produzem uma acidose metabólica (BARSTOW, 1994; WHIPP, 1994; GAESSER e POOLE, 1996). Nesse contexto, é bem conhecido que a fototerapia na faixa do infravermelho próximo pode melhorar a função mitocondrial, com possíveis mecanismos que consistem no melhor transporte do lactato através de transportadores monocarboxilados e oxidação do lactato para o processo de síntese de

ATP durante os exercícios (FERRARESI *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2012; FERRARESI e PARIZOTTO, 2013).

Tem sido relatado na literatura que a fototerapia pode promover melhora da atividade do complexo IV (citocromo c oxidase) (KARU, 2010) bem como dos outros complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (SILVEIRA *et al.*, 2009) em tecido muscular não lesionado ou sem estresse (HAYWORTH *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos têm reportado melhor vasodilatação, microcirculação e perfusão tecidual após o uso de LEDT-Efetivo sobre o corpo humano (MAK e CHEING, 2012). Dessa maneira, um melhor transporte e entrega de sangue para as células musculares, associado a um metabolismo mitocondrial aumentado, pode possivelmente modular as respostas do consumo de oxigênio (VO_2) durante os exercícios, dando suporte para resultados relacionados à cinética de VO_2 .

Lactato e creatina quinase (CK) sanguíneo e análises metabólicas em urina baseadas em 1H NMR

Os níveis de lactato no sangue normalizado pelo tempo limite de exercício realizado (T_{lim}) foram muito mais baixos após a fototerapia por LEDT-Efetivo, sugerindo uma melhor remoção do lactato produzido (DE MARCHI *et al.*, 2012), ou uma menor produção de lactato possivelmente pela inibição da enzima lactato desidrogenase (LDH), ou uma aumentada oxidação (consumo) nas mitocôndrias (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; FERRARESI e PARIZOTTO, 2013). No entanto, se a fototerapia na faixa do infravermelho próximo pode melhorar a vasodilatação e a microcirculação (MAK e CHEING, 2012), e conseqüentemente promover uma melhor remoção de lactato do tecido muscular, é importante então se mensurar a concentração de lactato na urina

(ENEA *et al.*, 2010; PECHLIVANIS *et al.*, 2010) bem como no sangue a fim de se identificar a relação entre a produção e a remoção de lactato durante os exercícios.

O teste de carga constante com LEDT-Efetivo teve os menores níveis de lactato no sangue e urina normalizados pelo tempo de exercício realizado. Esses resultados sugerem que os efeitos da fototerapia podem estar mais bem relacionados à diminuição de produção (e/ou aumento de seu consumo pelas mitocôndrias) (FERRARESI *et al.*, 2011; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; FERRARESI e PARIZOTTO, 2013) que a remoção do lactato como previamente reportado (DE MARCHI *et al.*, 2012; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013).

A CK tem sido usada como o “padrão ouro” para mensurar o dano muscular após exercícios de alta intensidade e frequentemente está relacionada a altos níveis de estresse oxidativo (DE MARCHI *et al.*, 2012). A fototerapia na faixa do infravermelho próximo parece modular o estresse oxidativo e prevenir o dano muscular se aplicada sobre os músculos antes dos exercícios de alta intensidade (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c; DE MARCHI *et al.*, 2012). De acordo com esses resultados prévios, os níveis de CK sanguíneo, normalizado pelo tempo limite de exercício, foram os menores quando a LEDT-Efetivo foi utilizada. Também, o aminoácido alanina foi quantificado na urina para mensurar a função renal, mas, sobretudo, a remoção de aminoácidos oriundos do possível dano muscular. Os níveis de CK estão associados com o dano muscular e os aminoácidos provenientes da quebra de proteínas são liberados na corrente sanguínea e conseqüentemente excretados na urina (ENEA *et al.*, 2010). O aumento de alanina na urina após exercícios de alta intensidade sugere que algum dano muscular ocorreu (ENEA *et al.*, 2010). Quando LEDT-Efetivo foi aplicada, a quantidade de alanina na urina normalizada pelo tempo limite de exercício foi mais baixa que na LEDT-2-Placebo, teste este que teve o segundo maior “ T_{lim} ” de exercício, sugerindo um efeito

protetor da LEDT-Efetivo contra o dano muscular, como previamente reportado (LEAL JUNIOR *et al.*, 2009c; FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013).

Outro importante metabólito identificado na urina foi a creatinina. Esse metabólito é frequentemente associado à disfunção renal em pacientes com doenças que promovem o catabolismo muscular (degradação de proteínas) (BAIRAKTARI *et al.*, 2002). No entanto, a presença de creatinina na urina de pessoas saudáveis submetidas a exercícios intensos sugere como a fosfocreatina está sendo metabolizada (PECHLIVANIS *et al.*, 2010). A fosfocreatina (associada a um maior estado energético das células) é produzida pela re-fosforilação de creatina pelo ATP. Assim, se mais ATP mitocondrial está disponível (efeitos da LEDT-Efetivo) é esperado um maior aporte energético nos músculos, que por sua vez poderia explicar uma aparente maior taxa de produção de ATP durante o início do exercício (PECHLIVANIS *et al.*, 2010; FERRARESI *et al.*, 2011). Assim, a produção de creatinina e sua excreção foram diminuídas somente após LEDT-Efetivo, sugerindo um melhor metabolismo energético alático.

Outros metabólitos também foram identificados, como a glicina, dimetilalanina (DMA) e trimetilalanina *N*-óxido (TMAO), os quais estão todos relacionados à função renal (BAIRAKTARI *et al.*, 2002). Altos níveis de acidose pode causar uma disfunção renal aguda por meio de uma acidose tubular (BAIRAKTARI *et al.*, 2002). De acordo com a literatura, a concentração de glicina normalizada pelo tempo limite “ T_{lim} ” de exercício no LEDT-1-Placebo e LEDT-2-Placebo foi bruscamente diminuído, sugerindo uma disfunção renal reversível (BAIRAKTARI *et al.*, 2002). Além disso, quando a LEDT-Efetivo foi aplicada, os níveis de glicina aumentaram, sugerindo uma menor disfunção renal. Por outro lado, uma aumentada excreção de dimetilalanina (DMA) e

trimetilalanina *N*-óxido (TMAO) sugere uma disfunção renal (BAIRAKTARI *et al.*, 2002; ENEA *et al.*, 2010). Em ambos os tratamentos placebos, a DMA e a TMAO foram mais intensamente excretadas no teste LEDT-2-Placebo, sugerindo pior função renal.

O desenho experimental de nosso trabalho teve como objetivo aplicar dois dias de terapia placebo a fim de demonstrar a pequena oscilação esperada entre testes de exercícios repetidos, ao contrário de outros estudos que realizaram apenas um teste durante os procedimentos de cruzamento entre os voluntários (DA SILVA ALVES *et al.*, 2014). Essa estratégia, para o nosso conhecimento, deve ser entendida como uma valiosa cautela para garantir que todas as mudanças no desempenho muscular e na cinética de VO_2 possivelmente é atribuível a LEDT-Efetivo, e que essas mudanças devem ser maiores que a oscilação normal entre os testes de exercícios repetidos, como demonstrado nos dois dias de terapia placebo (LEDT-Placebo).

No entanto, uma possível preocupação principal sobre os nossos resultados é a ordem das terapias, uma vez que a LEDT-Efetivo foi randomizada para o último dia de teste. Nesse momento, é muito importante destacar que devido a nossa estratégia de realizar 2 testes de exercício aplicando LEDT-Placebo, as mudanças esperadas nas repostas de VO_2 para um próximo teste usando LEDT-placebo pôde ser plotado (figura 3 – linhas pontilhadas), apesar de ser difícil medir o comportamento dessa oscilação, mas que certamente não é maior que ~ -9 s no $\Delta\tau$ [Figura 3C] (FAISAL; BEAVERS e HUGHSON, 2010).

Considerando essa mesma figura, é essencial notar que houve uma abrupta inflexão da resposta quando LEDT-Efetivo foi aplicada antes do teste de exercício (mesmo considerando essa normal oscilação ou influência decorrentes do “aprendizado” já discutidos), mostrando respostas superiores. Em outras palavras, nós fomos

extremamente cuidadosos para garantir que os efeitos da LEDT deveriam ser maiores que a oscilação pequena existente entre os testes, as quais são respostas fisiológicas normais e não significam melhor ou pior desempenho muscular. Além disso, o maratonista profissional que participou desse estudo tem 4 anos de experiência em corrida. Exercícios como os realizados nesse estudo são parte de seu programa de treinamento diário. Assim, o efeito de “aprendizado” em correr não é um argumento adequado, apesar de não ser conclusivo a partir desse estudo piloto.

Como um atleta de elite tem o seu ajuste de VO_2 otimizado próximo ao seu máximo, e as pequenas mudanças observadas ($\Delta\tau = -2s$ – figura 3C) entre os testes usando LEDT-Placebo, essas pequenas mudanças são devido à pequena oscilação esperada apesar de possível erro inerente ao processo de modelamento (ruído intra-respiração), uma vez que há insignificantes influências do ritmo circadiano sobre a cinética do VO_2 (FAISAL; BEAVERS e HUGHSON, 2010).

O presente estudo mostrou novos potenciais efeitos da fototerapia por LEDT sobre o desempenho muscular e a cinética do consumo de oxigênio (VO_2) durante testes intensos de carga constante (os quais simulam protocolos de treinamento de resistência) associado a análises metabólicas no sangue e urina usando análises de 1H NMR. No entanto, devem ser evitadas generalizações dos resultados encontrados, pois esse estudo envolveu apenas um maratonista profissional como participante. Nós encorajamos mais pesquisadores a reproduzirem este estudo com mais atletas para corroborarem nossos achados, além de investigarem outras adaptações musculares como a expressão gênica e o consumo de oxigênio muscular.

CONCLUSÃO

A fototerapia por LEDT (*light-emitting diode therapy*), usando um arranjo de LEDs emitindo luz na faixa do infravermelho próximo e dose aplicada nesse estudo possivelmente pode melhorar a cinética do consumo de oxigênio (VO_2); aumentar o tempo de exercício; diminuir o dano muscular, fadiga e a disfunção renal durante o exercício de corrida realizado em esteira ergométrica.

**Efeitos da fototerapia de baixa intensidade sobre a capacidade aeróbia em
humanos: estudo duplo-cego, randomizado, cruzado e controlado por
placebo**

RESUMO

O pré-condicionamento muscular usando a fototerapia por laser e LEDs (*light-emitting diodes*) tem proporcionado efeitos benéficos sobre o desempenho muscular. No entanto, embora existam muitos estudos na literatura estabelecendo a interação positiva entre a luz e mitocôndrias celulares, poucos estudos investigaram os efeitos da fototerapia sobre a capacidade aeróbia, sobretudo em humanos. O objetivo desse estudo duplo-cego, randomizado, cruzado e controlado por placebo foi investigar se fototerapia usando LEDs (*light-emitting diode therapy* – LEDT) aplicada antes (pré-condicionamento muscular) de exercício moderado em cicloergometro pode modular a capacidade aeróbia (cinética do consumo de oxigênio – $\dot{V}O_2$, produção de dióxido de carbono – $\dot{V}CO_2$, frequência cardíaca – FC e débito cardíaco – \dot{Q}) e os níveis de lactato sanguíneo de homens jovens. A LEDT usou um arranjo flexível de 200 LEDs, dispostos em 25 arranjos de 4 LEDs infravermelhos (830 ± 20 nm; 120 mW) e 25 arranjos de 4 LEDs vermelhos (630 ± 10 nm; 60 mW). Oito voluntários participaram do estudo e foram avaliados em cicloergometro duas vezes no primeiro dia de avaliação e duas vezes no segundo dia, sempre nos períodos da manhã e tarde (separados por 6 horas). A LEDT utilizou uma dose de luz (180 J) recomendada e utilizada em estudos prévios ou Placebo (0 J) aplicada sobre o quadríceps femoral, isquiotibiais e tríceps sural de ambos os membros inferiores dos voluntários uma única vez em cada dia de avaliação, sempre 30 minutos antes do início do protocolo de exercício. Os dias de avaliação foram separados por 1 semana (7 dias) para o procedimento de cruzamento entre os grupos. A cinética de $\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$, FC e \dot{Q} foi analisada no domínio do tempo e frequência. A LEDT não modulou significativamente ($P > 0,05$) a cinética de nenhum dos parâmetros testados e os níveis sanguíneos de lactato intra e/ou intergrupos. Esses resultados

sugerem que a LEDT não modulou a capacidade aeróbia de homens jovens em exercício moderado.

Palavras-chave: VO₂, cinética, LEDT, laser, fototerapia

INTRODUÇÃO

Estudos prévios já demonstraram uma interação entre a luz e tecidos biológicos mediada pelas mitocôndrias celulares (PASSARELLA *et al.*, 1984; KARU, 1999). O principal cromóforo que absorve a luz emitida por laser de baixa intensidade e LEDs (*light-emitting diodes*) parece ser a citocromo c oxidase (Cox) (KARU, 1999; KARU; PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2004; KARU, 2010), a qual é uma enzima localizada na cadeia transportadora de elétrons (CTE) (MASHA; HOURELD e ABRAHAMSE, 2013). Essa enzima é capaz de absorver a luz com comprimentos de onda específicos (entre 600-900 nm) (HUANG *et al.*, 2009), promovendo modulações sobre a CTE (MASHA; HOURELD e ABRAHAMSE, 2013) que por sua vez aumenta o potencial de membrana mitocondrial (PASSARELLA *et al.*, 1984) e a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (PASSARELLA *et al.*, 1984; KARU; PYATIBRAT e KALENDU, 1995) necessário para as atividades celulares.

Desde que estudos prévios relataram os efeitos da luz sobre as mitocôndrias, muitos estudos têm investigado os benefícios da fototerapia de baixa intensidade (luz emitida por lasers e LEDs) sobre a dor e lesões teciduais (ENWEMEKA *et al.*, 2004), como também sobre tecidos saudáveis (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013). Entre algumas aplicações sobre os tecidos sem lesão, o músculo esquelético recentemente tem recebido especial atenção, sobretudo, em investigações acerca dos benefícios da fototerapia no desempenho muscular, seja com o uso dessa terapia antes dos exercícios (pré-condicionamento muscular), ou após os exercícios (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Esses benefícios podem ser sumarizados em redução da fadiga muscular e dos níveis de lactato sanguíneo e dano muscular; aumento no número de repetições máximas, carga de trabalho e força muscular (FERRARESI;

HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013).

No entanto, surpreendentemente poucos estudos investigaram a influência da fototerapia sobre exercícios predominantemente aeróbios (CAMARGO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012; AQUINO *et al.*, 2013). Uma vez que os efeitos da fototerapia são possivelmente desencadeados pelo metabolismo mitocondrial (KARU, 1999), é possível que o consumo de oxigênio muscular (VO_2) possa ser modulado. Além disso, estudos prévios já relataram uma dose-resposta bifásica para a fototerapia (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011) que oscila entre bons efeitos, nenhum efeito ou até mesmo efeitos deletérios.

Por essa razão, um recente estudo de revisão sistemática com meta-análise (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013) propôs algumas doses (energia por ponto – J) que possivelmente podem ser úteis para resolver essa questão de dose-resposta quando a fototerapia é usada para promover o pré-condicionamento muscular. Além disso, estudos prévios (PASSARELLA *et al.*, 1984; KARU; PYATIBRAT e KALENDU, 1995) já relataram que os efeitos da fototerapia sobre as mitocôndrias são também dependentes do tempo (tempo-resposta) após a exposição à luz.

Esse presente estudo duplo-cego, randomizado, cruzado e controlado por placebo teve como objetivo verificar se as respostas aeróbias em humanos poderiam ser otimizadas pela fototerapia de baixa intensidade emitida pela terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*). Para essa proposta, um arranjo de LEDs foi usado para realizar o pré-condicionamento muscular 30 minutos e 6 horas (na tentativa de cobrir o tempo-resposta) antes de testes ergométricos em cicloergometro.

Os possíveis efeitos sobre a capacidade aeróbia mediados pela LEDT foram investigados por uma caracterização precisa da resposta de VO_2 através de análises no

domínio do tempo e frequência. Adicionalmente analisamos os níveis sanguíneos de lactato. Nós hipotetizamos que a LEDT poderia otimizar a resposta muscular aeróbia durante o exercício.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho experimental

Oito homens jovens (23 ± 2 anos, 171 ± 5 cm e 75 ± 14 kg) fizeram parte desse estudo duplo-cego, randomizado, cruzado e controlado por placebo [Figura 1A]. Após todos os participantes assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da University of Waterloo (CAN), eles foram avaliados durante 2 dias não consecutivos (separados por uma semana – *washout*), e 2 vezes em cada dia (separados por 6 horas – manhã e tarde), totalizando 4 visitas. A LEDT ou Placebo foi aplicado durante o período da manhã e os protocolos de exercícios iniciaram 30 minutos (PRBS1) e 6 horas (PRBS2) após cada terapia. O mesmo protocolo PRBS (*pseudorandom binary sequence*) foi repetido 3 vezes em cada protocolo (PRBS1 e PRBS2) a fim de garantir a melhor reprodutibilidade dos dados [Figura 1B]. Todos os participantes realizaram uma familiarização ao cicloergometro e ao protocolo PRBS (1 minuto a 25 W e 1 minuto a 100 W) antes de iniciarem cada teste.

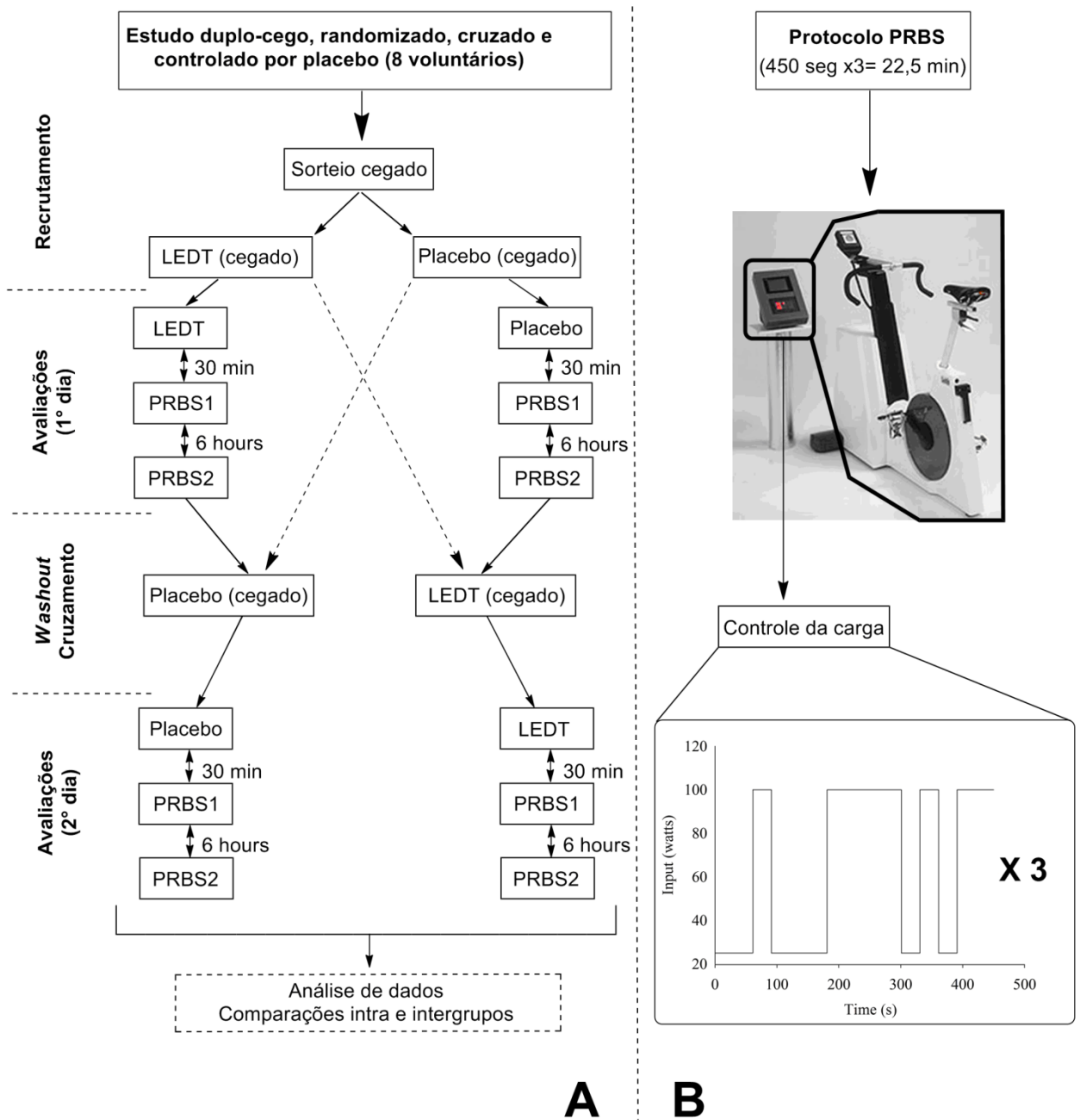


Figura 1. Fluxograma (1A) e protocolo de exercício (PRBS) (1B). Siglas: LEDT= *light-emitting diode therapy*; PRBS= *pseudorandom binary sequence exercise*.

Procedimentos de randomização, cruzamento e cegamento

A randomização foi gerada no Randomization.com (<http://www.randomization.com>) usando permutações em 2 blocos e 2 terapias: LEDT e Placebo. Assim, se o voluntário recebesse a LEDT no primeiro dia de avaliação, obrigatoriamente receberia a terapia placebo no segundo dia, ou vice-versa, garantindo o cruzamento dos voluntários [Figura 1A].

Os voluntários e os avaliadores não souberam se a LEDT aplicada durante cada coleta de dados era efetiva ou placebo. Esse procedimento de cegamento da terapia foi possível devido a um botão, escondido no aparelho, o qual selecionava a terapia efetiva ou placebo. Esse botão foi selecionado previamente sem o conhecimento dos voluntários e dos avaliadores. A seleção desse botão foi realizada por um único pesquisador que participou dos procedimentos de randomização, aplicação da LEDT e coleta de dados, mas sem acesso à análise de dados.

Terapia LED (light-Emitting Diode Therapy (LEDT))

Foi utilizado um arranjo de 200 LEDs (100 na faixa do infravermelho – 830 ± 20 nm; e 100 na faixa do vermelho – 630 ± 10 nm) especialmente construído para essa pesquisa. Esse arranjo de LEDs tem 18x38 cm e composto por 25 arranjos de 4 LEDs infravermelhos mais 25 arranjos de 4 LEDs vermelhos [Figura 2]. O tempo de irradiação foi de 40 segundos sobre cada um dos grupos musculares, de ambos os membros inferiores envolvidos no exercício em cicloergometro (quadríceps femoral, isquiotibiais e tríceps sural) com parâmetros fixos descritos na tabela 1. A LEDT ou placebo foi aplicado somente uma vez por dia (de manhã), de acordo com o desenho experimental. A terapia placebo não emitiu energia (0 J) e potência (0 mW) sobre os músculos dos membros inferiores dos grupos. Os parâmetros ópticos desse equipamento

foram mensurados com um medidor de potência e energia PM100D Thorlabs® com sensor S130C (área de 0,70 cm²). A energia (Joule – J) aplicada sobre cada ponto (cada arranjo de 4 LEDs) e grupo muscular foi baseada em recente revisão sistemática com meta-análise (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013) e estudo clínico (DE MARCHI *et al.*, 2012).

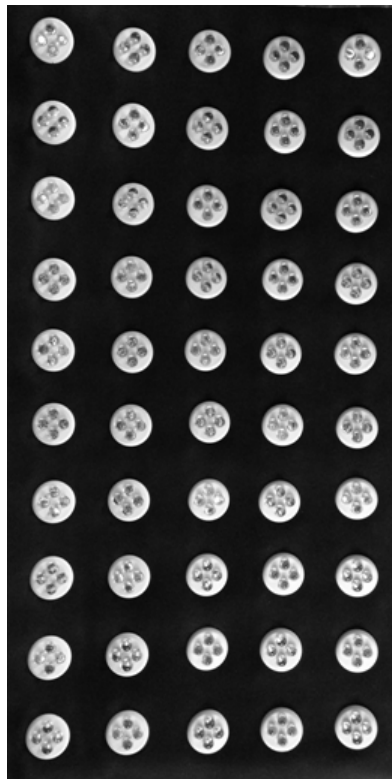


Figura 2. Arranjo de 200 LEDs (*light-emitting diodes*): 100 na faixa do infravermelho (830 nm) agrupados em 25 arranjos de 4 LEDs; 100 na faixa do vermelho (630 nm) agrupados em 25 arranjos de 4 LEDs.

Tabela 1. Parâmetros da terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*) e local de aplicação da LEDT sobre os membros inferiores antes do protocolo de exercício (PRBS).

Número de LEDs: 200 (100 infravermelho-IR and 100 vermelho-RED)
Comprimento de onda: 830 nm (IR) and 630 nm (RED)
Frequência de pulso: contínuo
Número de arranjos de 4 LEDs: 25 (IR) e 25 (RED)
Potência óptica (cada arranjo de 4 LEDs): 120 mW (IR) e 60 mW (RED)
Potência óptica total: 4.500 mW (25 x 120 mW + 25 x 60 mW)
Área de cada LED: 0,2 cm ²
Densidade de potência (cada arranjo): 171,42 mW/cm ² (IR) e 85,71mW/cm ² (RED)
Tempo de tratamento: 40 seg
Energia (cada arranjo de 4 LEDs) em 40 seg: 4,8 J (IR) e 2,4 J (RED)
Densidade de energia (cada arranjo de 4 LEDs) em 40 seg: 6,85 J/cm ² (IR) e 3,42 J/cm ² (RED)
Energia total aplicada: 180 J [4,8 J x 25= 120 J (IR) mais 2,4 x 25= 60 J (RED)]
Grupos musculares: A) quadriceps femoral; B) isquiotibiais; C) tríceps sural
Energia total aplicada sobre o corpo: 540 J
Modo de aplicação: contato

Protocolo de exercício - PRBS (pseudorandom binary sequence)

Todos os testes PRBS foram realizados em cicloergometro freado eletricamente e controlado por um módulo de controle externo (Lode Excalibur Sport, Lode B.V., Groningen, Netherlands). A carga do protocolo PRBS (Figura 1B) foi alcançada após 1,5 seg de transição e foi de 25 a 100 W, com uma cadência constante de 60-65 rpm. De acordo com estudos prévios da literatura (HUGHSON; SHERRILL e SWANSON, 1988; HUGHSON *et al.*, 1990; HUGHSON *et al.*, 1991), a combinação entre essa cadência e carga de trabalho não eleva o VO₂ além do limiar anaeróbio ventilatório de voluntários saudáveis, caracterizando o exercício como moderado.

Após 2 minutos iniciais de aquecimento a 100 W e 3 minutos extras de linha de base, foi iniciado o protocolo PRBS composto por 15 unidades (25 ou 100 W) de 30 segundos de duração (450 seg para cada PRBS) e cada PRBS foi repetido 3 vezes seguidamente, totalizando 22,5 minutos). Os dados coletados durante os três PRBS

consecutivos foram interpolados segundo a segundo e então foi obtida a média para um único PRBS de cada visita (placebo: manhã e tarde; LEDT: manhã e tarde).

A escolha para usar essa frequência específica e potência (W) para a carga foi baseada em estudo prévio de Essfeld et al. [20] que relacionou o (VO_2) com fatores não hemodinâmicos, ou seja, cinética de VO_2 predominantemente mantida pelo trabalho muscular (alvo da LEDT nesse estudo). A cinética de VO_2 para esse tipo de protocolo é dependente da habilidade do sistema cardiorrespiratório (conhecida como capacidade aeróbia) e muscular em ofertar e usar o oxigênio (O_2), respectivamente. Essa habilidade modula o ritmo do aumento de VO_2 após o estímulo do exercício e uma cinética mais rápida é relacionada a uma melhor capacidade aeróbia (aqui promovida hipoteticamente pela LEDT). Dessa maneira, quaisquer mudanças na capacidade aeróbia muscular (possivelmente causada por modificações sobre a utilização de O_2 devido à absorção da luz pela Cox) irá influenciar a resposta do VO_2 no domínio de tempo [Figura 3A e C) e frequência (Figura 3B e D).

A caracterização da cinética de VO_2 geralmente envolve algumas manipulações matemáticas dos dados, a fim de forçar a resposta observada a se encaixar em funções conhecidas. Essas funções (exponencial e sinusoidal para os domínios do tempo e frequência, respectivamente) contêm parâmetros que podem ser associados à capacidade aeróbia (com significância fisiológica) de uma maneira sistemática. Mudanças no comportamento do VO_2 irão influenciar ambos os parâmetros descritos na figura 3. Dessa maneira, esses dois modelos são complementares.

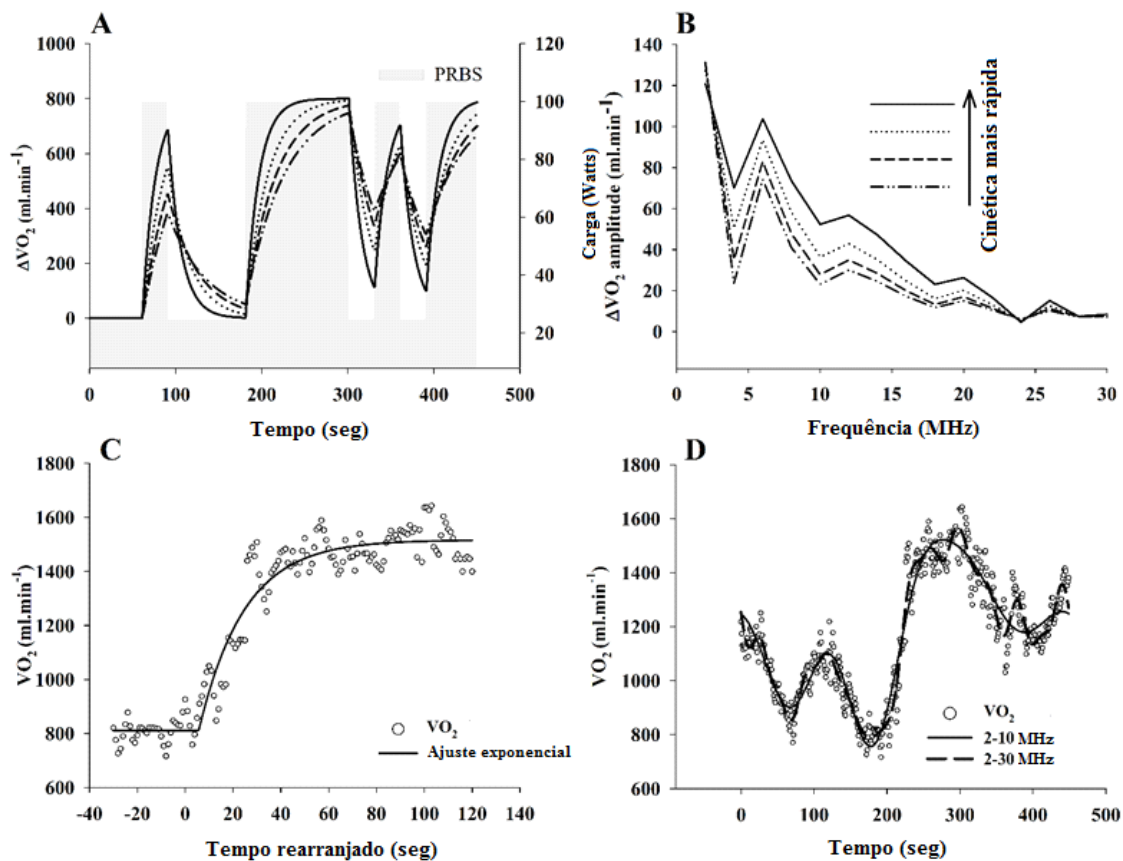


Figura 3. A) Descrição de tempo-resposta hipotética para VO_2 que varia a velocidade de adaptação (exemplos de cinéticas lentas ••• para rápida —) para uma dada alteração na carga de trabalho (PRBS - *pseudorandom binary sequence*). Esses mesmos dados podem ser traduzidos para o domínio da frequência (3B) onde a amplitude de VO_2 para cada função sinusoidal pode ser calculada para cada frequência específica. Observa-se que uma cinética mais rápida apresenta amplitudes maiores para uma dada frequência. Figura 3C é uma representação da resposta de VO_2 de um voluntário. A janela de dados corresponde ao intervalo de 150-300 seg (30 seg de 25 W e 120 seg de 100 W) do protocolo PRBS original. O tempo foi rearranjado a fim de ajustar os dados utilizando uma função exponencial iniciando no tempo zero. Para este mesmo participante, toda a resposta de VO_2 no PRBS foi analisada no domínio da frequência (como descrito na figura 3B). Considerando-se a linearidade da resposta de entrada e saída, o sinal de VO_2 foi ajustado de volta para o domínio do tempo pela soma (princípio da superposição) de cada sinusoidal ajustada (Figura 3D). Siglas: PRBS = *pseudorandom binary sequence* e VO_2 = consumo de oxigênio.

Aquisição dos dados

Trocas gasosas pulmonares: foram mensuradas respiração a respiração usando V_{\max} system (CareFusion, San Diego, CA, USA). Esse sistema estima o volume de O_2 através de um sensor de fluxo de massa de baixa resistência (> 97% de acurácia), pressão de O_2 por meio de uma célula eletroquímica (> 99% de acurácia) e pressão de CO_2 por meio de luz infravermelha com uma pilha termoelétrica (> 99% de acurácia). Antes de cada visita, a concentração dos gases e volumes do sistema foi calibrada seguindo as especificações do fabricante.

Débito cardíaco (\dot{Q}): foi estimado batimento a batimento (Finometer, Finapres Medical System, Arnhem, The Netherlands) por análises da pressão da onda do pulso no terceiro dedo da mão direita dos voluntários (Modelflow algorithm). Durante o teste em cicloergometro, a mão direita dos voluntários foi mantida ligeiramente abaixo do nível cardíaco e um transdutor de pressão foi usado para a correção da pressão do dedo para combinar com a pressão ao nível do coração. A frequência cardíaca (FC) foi mensurada batimento a batimento usando um sistema de eletrocardiograma (Pilot 9200, Colin Medical Instruments, San Antonio – TX, USA). Assim como realizado nos dados de VO_2 , os dados de \dot{Q} e FC foram interpolados segundo a segundo e os dados finais de cada visita foi a média dos três PRBS consecutivos.

Lactato: antes de cada protocolo de exercício e exatamente 5 minutos após, foi mensurada a concentração de lactato sanguíneo retirando-se uma gota de sangue de um dos dedos da mão dos voluntários. A concentração de lactato foi mensurada usando Lactate ProTM (ARKRAY, JPN) previamente calibrado. Quando a concentração de

lactato foi inferior a 0,8 (mmol.l⁻¹) ou maior que 2 (mmol.l⁻¹), foi realizado um reteste para confirmar os resultados.

Análises no domínio do tempo e frequência

A duração dos dados da cinética de VO₂ no domínio do tempo foi de 150 seg (30 seg de 25 W e 120 seg de 100 W) iniciando no 150º segundo do protocolo PRBS. O tempo foi rearranjado a fim de coincidir o tempo zero (t = 0 seg) com o início da carga de 100 W (t= 180 seg). Esta janela corresponde ao mais longo período sem qualquer alteração de cargas. Finalmente, os dados foram ajustados por um modelo mono-exponencial:

$$VO_2(t - 180) = a_0 + a * \left(1 - \exp^{-\frac{(t-TD)}{\tau}}\right); \text{for } -30 < t < 120,$$

Onde “t” é tempo; “a₀” é o VO₂ durante o estágio de 25 W (linha de base); “a” é a amplitude do estado estável de VO₂ durante o estágio de 100 W; “τ” velocidade de ajuste do consumo de oxigênio e “TD” é o tempo de atraso da resposta exponencial, respectivamente.

O domínio da frequência foi aplicado sobre as médias dos PRBS de cada visita para VO₂, VCO₂, \dot{Q} e FC. Foi usada transformação de Fourier para ajustar os dados a cada frequência específica, de modo a obter a melhor função sinusoidal (com as suas amplitudes e atrasos correspondentes) de acordo com:

$$VO_2, VCO_2, \dot{Q} \text{ or } FC(t) = a_0 + 2 * \sum_{n=1}^6 (A_n * \cos(2\pi * n * f_1 * t) + B_n * \sin(2\pi * n * f_1 * t),$$

onde “a₀” é o valor da linha de base, “n” é o número harmônico, “f₁” é a frequência fundamental (1/450 Hz nesse caso), “A_n” e “B_n” são o cosseno e o seno das amplitudes, respectivamente. A partir de A_n e B_n, a amplitude sinusoidal total ($A_t = \sqrt{A_n^2 + B_n^2}$) pôde ser calculada para cada frequência.

Ambas as análises foram realizadas por um programa específico criado com o uso de linguagem “G” (LabView 2012, National Instruments, Austin, TX, USA). Este programa se ajusta aos dados usando um processo interativo em tempo real (algoritmos múltiplos de Levenberg-Marquardt) que encontram a menor soma de quadrados dos erros (diferenças entre os dados reais e a função descoberta). Todas as funções calculadas mostraram um nível de concordância superior a 95%.

Análise estatística

A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk’s W. As amplitudes de VO₂, VCO₂, FC e \dot{Q} e lactato sanguíneo foram comparados intragrupos (PRBS1-30min *versus* PRBS2-6h) e intergrupos (LEDT *versus* Placebo) usando análise de variância (ANOVA) de duas vias (*two-way*) com medidas repetidas. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

As comparações intra e intergrupos não apresentaram significâncias estatísticas ($P > 0.05$) para as amplitudes de VO_2 , VCO_2 , FC e \dot{Q} (Figura 4A, B, C e D, respectivamente), assim como para as concentrações de lactato sanguíneo [Tabela 2].

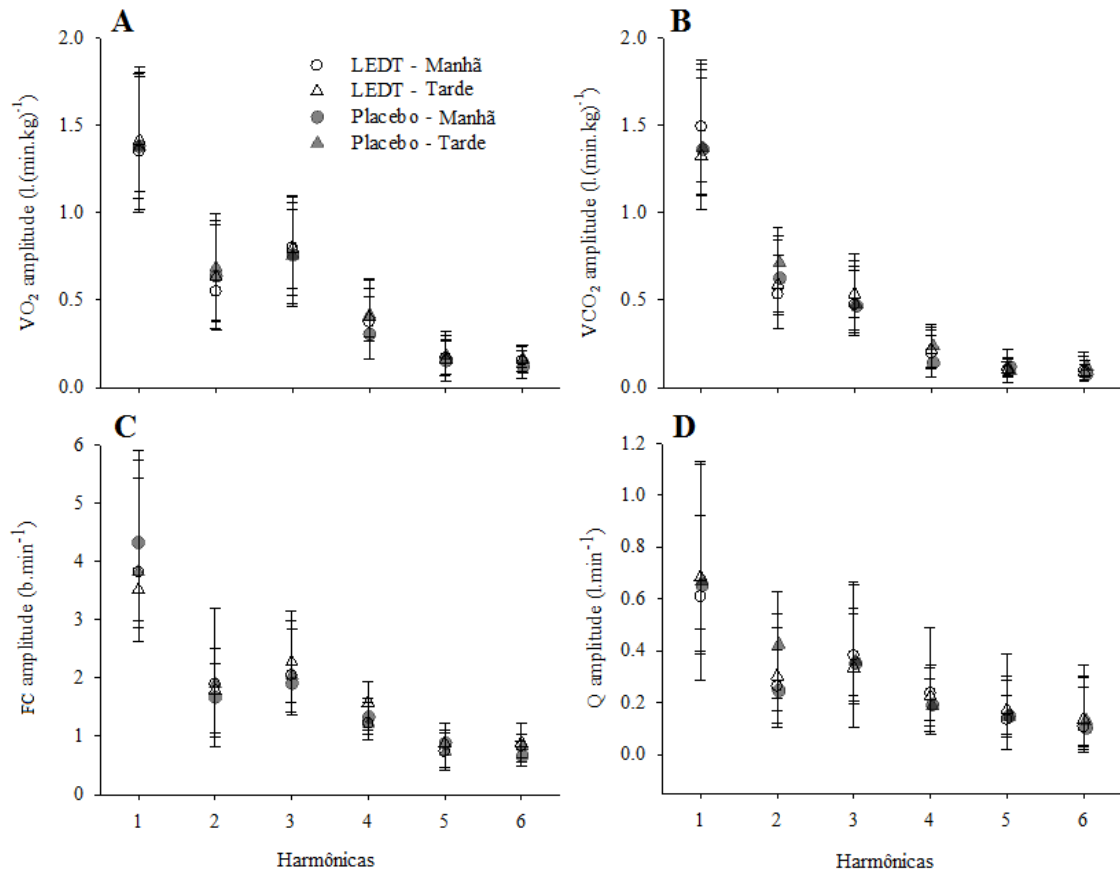


Figura 4. Resultados das amplitudes para as harmônicas 1 (2 mHz) a 6 (13 mHz). Siglas: VO_2 = consumo de oxigênio; VCO_2 = produção de dióxido de carbono; FC= frequência cardíaca; \dot{Q} = débito cardíaco; LEDT= *light-emitting diode therapy*.

Tabela 2. Resultados da concentração de lactato sanguíneo (mmol.l^{-1}) antes e após cada protocolo PRBS (*pseudorandom binary sequence*) realizado no período da manhã (PRBS-30min) e à tarde (PRBS-6h) usando a terapia LED (*light-emitting diode therapy* – LEDT) ou Placebo

Lactato	PRBS1		PRBS2	
	30min - linha de base	30min - final	6h – linha de base	6h - final
Placebo	$1,47 \pm 0,46$	$2,61 \pm 1,75$	$1,11 \pm 0,25$	$2,67 \pm 1,97$
LEDT	$1,35 \pm 0,25$	$2,82 \pm 1,52$	$1,10 \pm 0,22$	$2,63 \pm 1,60$

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) para qualquer comparação intra ou intergrupos.

Também não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) para a cinética de VO_2 analisada no domínio do tempo e da frequência [Figura 5].

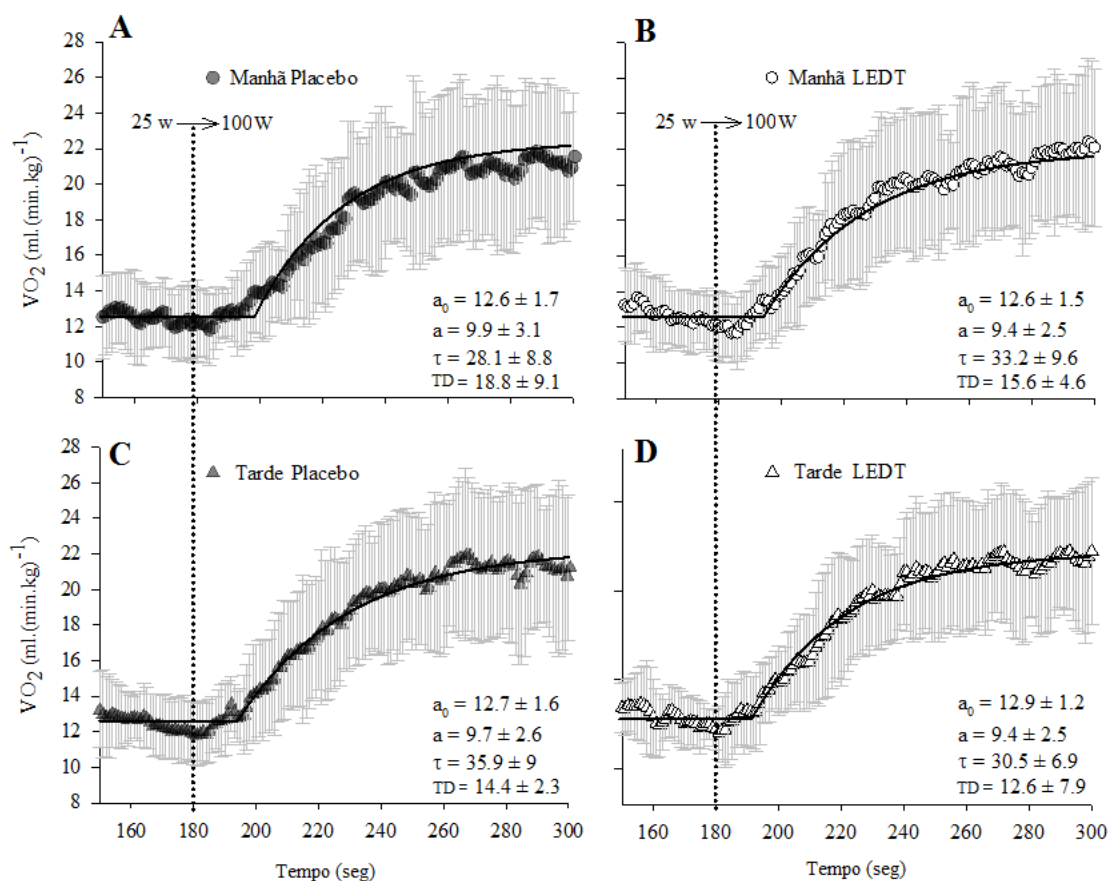


Figura 5. Gráficos de segundo a segundo para a resposta de VO_2 (símbolo \pm desvio padrão) e a média da função exponencial ($\bar{a}VO_2 = \bar{a}a_0 + \bar{a}a * (1 - exp^{-(\bar{a}t - \bar{a}TD)/\bar{a}\tau})$). 5A, B, C e D mostram a cinética de VO_2 para as condições: manhã-placebo, manhã-LEDT, tarde-placebo, tarde-LEDT, respectivamente. É importante observar a resposta semelhante para todas as condições, comparando os parâmetros da equação (média \pm desvio padrão). Siglas: VO_2 = consumo de oxigênio; LEDT= *light-emitting diode therapy*; a_0 = linha de base para o VO_2 ; a = VO_2 no estado estável; τ = velocidade de ajuste do consumo de oxigênio (VO_2) e TD= é o tempo de atraso da resposta exponencial.

DISCUSSÃO

Esse estudo duplo-cego, randomizado, cruzado e controlado por placebo investigou os efeitos do pré-condicionamento muscular usando a terapia LED (*light-emitting diode therapy – LEDT*) sobre a cinética do consumo de oxigênio (VO_2). Análises no domínio do tempo e da frequência mostraram que não houve mudanças significativas nas amplitudes de VO_2 , produção de dióxido de carbono (VCO_2), frequência cardíaca (FC), débito cardíaco (\dot{Q}), assim como para o VO_2 na linha de base, VO_2 na fase estável, velocidade de ajuste do VO_2 e tempo de atraso das respostas exponenciais (TD). Os resultados encontrados foram muito similares.

O pré-condicionamento muscular usando a fototerapia de baixa intensidade (luz emitida por lasers e LEDs) tem demonstrado bons resultados na melhora do desempenho muscular e diminuição dano muscular induzido pelo exercício (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013).

Estudos clínicos anteriores reportaram incrementos em respostas aeróbias como o consumo máximo de oxigênio e o tempo de exercício comparado à terapia placebo (DE MARCHI *et al.*, 2012) e aumentos no VO_2 pico e eficiência cardiovascular (DA SILVA ALVES *et al.*, 2014). No entanto, como relatado na literatura, a fototerapia tem uma possível dose-resposta (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011) que por sua vez sugere possíveis doses de luz ideais para estimularem os tecidos biológicos para reparar, ou inibir processos biológicos como síndromes dolorosas. Por essa razão, a World Association for Laser Therapy (WALT - <http://waltza.co.za/>) tem recomendado doses de luz para diferentes tratamentos. Recentemente, uma revisão sistemática com meta-análise sugeriu doses ideais para a realização do pré-condicionamento muscular pela fototerapia (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). Assim como reportado nesse estudo,

diodos de laser e LEDs emitindo luz na faixa do vermelho ou infravermelho próximo são ideais para o pré-condicionamento muscular com potências ópticas entre 50 mW e 200 mW, e doses (energia – J) de 5 J e 6 J por ponto de irradiação a cada 5 cm² (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013). No entanto, mesmo esse presente estudo usando um arranjo de LEDs emitindo luz na faixa do infravermelho (830 nm) e vermelho (630 nm) ao mesmo tempo, com potências ópticas de 60 mW (vermelho) e 120 mW (infravermelho), energia por ponto de 2,4 J (vermelho) e 4,8 J (infravermelho) a cada 5 cm², todos os resultados indicam nenhum efeito sobre qualquer variável relacionada a cinética de VO₂.

É importante destacar também o tempo-resposta entre a realização do pré-condicionamento muscular e o início de cada protocolo de exercício (PRBS) usado nesse estudo. Estudos prévios reportaram efeitos significativos da fototerapia por laser sobre o potencial de membrana mitocondrial e síntese de ATP em hepatócitos usando um intervalo de 3 minutos entre a irradiação e as análises (PASSARELLA *et al.*, 1984). Outro estudo usando células de câncer cervical (HeLa) reportou incrementos de ATP induzido pela fototerapia por laser após 20-25 minutos da irradiação (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995); DE MARCHI *et al.* (2012) aplicaram a fototerapia também por laser sobre os músculos dos membros inferiores em humanos 5 minutos antes de um protocolo de exercício incremental; e DA SILVA ALVES *et al.* (2014) aplicou a fototerapia por laser também sobre os músculos dos membros inferiores de humanos 10 minutos antes de um protocolo incremental de exercício em esteira. Além desses resultados clínicos, estudos em modelo experimental observaram uma modulação na atividade da enzima Cox (relacionada ao metabolismo mitocondrial) com intervalos de tempo entre 5 minutos a 24 horas após a irradiação de músculo esquelético de ratos (HAYWORTH *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE-PONTES *et al.*, 2014).

Os nossos resultados são intrigantes e sugerem uma inadequada dose de luz ou inadequado tempo para se iniciar o protocolo de exercício, ou ainda a combinação de ambas as hipóteses. Analisando nossos resultados com um maior detalhamento, se a dose de luz foi adequada, possivelmente pequenas mudanças poderiam apontar para uma melhor ou pior cinética de VO_2 e maior ou menor concentração de lactato sanguíneo devido a modulações no metabolismo mitocondrial. Para o nosso entendimento, esse mesmo argumento é válido considerando o tempo-resposta usado nesse estudo. Essas suposições são baseadas no estudo de ALBUQUERQUE-PONTES *et al.* (2014) que mostrou uma dose-resposta bifásica e um tempo-resposta bifásico para a luz na faixa do vermelho (660) e infravermelho (830 nm) aumentarem o percentual de área colorida por fibra muscular de ratos em reações de imuno-histoquímica para a atividade da Cox (enzima da cadeia transportadora de elétrons), bem como o percentual de fibras positivamente marcadas com o anticorpo para Cox com um intervalo de tempo entre 5 minutos a 12 horas após a irradiação com laser de baixa intensidade.

Nós temos ciência de que luz é luz (ENWEMEKA, 2005) e por essa razão, considerando a possível dose-resposta bifásica da fototerapia sobre o tecido muscular, nós sugerimos que mais estudos investiguem os efeitos da fototerapia usando lasers e LEDs para elucidarmos qual é a melhor dose (energia – J) aplicada por ponto e também a dose de luz total aplicada por cada grupo muscular, uma vez que o nosso estudo aplicou 180 J sobre o quadríceps femoral como realizado por DE MARCHI *et al.* (2012), mas excedeu os 42 J aplicados por DA SILVA ALVES *et al.* (2014). Considerando a energia total por membro, nosso estudo aplicou 540 J, excedendo os 360 J aplicados por DE MARCHI *et al.* (2012), e os 56 J aplicados por DA SILVA ALVES *et al.* (2014). Considerando o tempo-resposta, nós sugerimos também mais estudos para se investigar qual é o melhor tempo para se realizar o pré-condicionamento

muscular, uma vez que estudos prévios usaram 5 minutos (DE MARCHI *et al.*, 2012), 10 minutos (DA SILVA ALVES *et al.*, 2014), e esse presente estudo usou 30 minutos e 6 horas baseando-se nos efeitos da fototerapia sobre a Cox durante 5 minutos a 24 horas após a irradiação (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995; HAYWORTH *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE-PONTES *et al.*, 2014). Finalmente, sugerimos que é necessário investigar se os parâmetros usados em exercícios de força ou alta intensidade, como a maioria dos estudos reportados na literatura (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; BORSA; LARKIN e TRUE, 2013; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2013), produzem os mesmos incrementos de desempenho em exercícios moderados e com predominância do metabolismo aeróbio, como usado nesse estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos estudos da presente tese, podemos considerar que:

- Células musculares aumentam o seu potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP com uma resposta pico entre 3 horas e 6 horas após a irradiação com a terapia LED (LEDT). Além disso, 24 horas após a LEDT ainda temos melhores respostas para a síntese de ATP quando comparado ao controle.
- A LEDT aplicada como pré-condicionamento muscular aumentou a resistência muscular à fadiga e a quantidade de ATP muscular em animais também com um mesmo padrão de tempo-resposta observado no estudo com células musculares. No entanto, a melhor resposta foi observada 6 horas após a irradiação por LEDT sobre os músculos dos membros inferiores e musculatura inferior das costas dos animais. Além desses resultados, o pré-condicionamento muscular com os tempos de 3 horas e 24 horas foram melhores quando comparados aos grupos que receberam a LEDT 5 minutos antes das avaliações de ATP e fadiga, assim como quando comparados ao grupo controle.
- Quando estivermos diante de um programa de treinamento, a LEDT é mais eficiente para aumentar a carga de trabalho, síntese de ATP, glicogênio, proliferação de células musculares, metabolismo mitocondrial e defesa contra o estresse oxidativo quando aplicada após cada sessão de treinamento.
- A modulação da expressão gênica do tecido muscular é um dos principais fatores responsáveis para o melhor desempenho nas competições e exercícios. Nesse sentido, observamos que a terapia por laser de baixa intensidade (LLLT) modula a transcrição de todo o genoma humano, conduzindo a melhores

respostas de desempenho muscular em exercícios de força. Esses resultados foram corroborados por meio da utilização da LEDT em indivíduos geneticamente comparáveis (gêmeos idênticos) que possuíam o mesmo perfil alimentar, o mesmo nível de aptidão física (atletas universitários) e as mesmas atividades de vida diária.

- O pré-condicionamento muscular usando a LEDT para evitar lesões musculares em esportes de alto rendimento parece ser eficiente, como visto em atletas de voleibol em jogos oficiais. No entanto, a LEDT além de demonstrar um tempo-resposta, também apresenta uma dose-resposta. Além dessa observação, o pré-condicionamento muscular realizado 5 minutos antes dos exercícios físicos parece não ser regra, como já demonstrado nos estudos *in vitro* e com modelos animais dessa presente tese, e no estudo clínico com atletas profissionais de voleibol que receberam o pré-condicionamento muscular por LEDT 40 a 60 minutos antes dos jogos oficiais da Superliga de voleibol masculino.
- A fototerapia apresenta um tempo-resposta e uma dose-resposta. Para prevenção de dano muscular, as doses preconizadas na literatura parecem ser eficientes quando utilizadas para promover o pré-condicionamento muscular. No entanto, essas mesmas doses parecem não ser eficientes quando utilizadas para estimular o metabolismo energético, como o mitocondrial (aeróbico), que é predominante em exercícios de baixa a moderada intensidade, como utilizado no último estudo dessa tese.
- Podemos concluir que existe um tempo necessário para os músculos absorverem a energia luminosa emitida por lasers e LEDs de baixa intensidade e transformarem essa energia em respostas bioquímicas para o aumento de desempenho muscular em regimes de pré-condicionamento muscular, ou

acelerar a recuperação muscular pós-exercício. Entendemos também que o pré-condicionamento muscular realizado 5 minutos antes do exercício, comumente reportado na literatura até o presente momento, pode ser fortemente melhorado se respeitarmos o tempo-resposta de 3 a 6 horas. No entanto, além do tempo-resposta, a fototerapia por lasers e LEDs apresenta também uma dose-resposta e que deve ser adequada para cada tipo de proposta de tratamento: prevenção do dano muscular ou melhora de desempenho via estímulo ao metabolismo energético, modulação da expressão gênica e síntese de ATP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, P. Making muscles "stronger": exercise, nutrition, drugs. **J Musculoskelet Neuronal Interact** [S.I.], v. 4, n. 2, p. 165-74, Jun 2004.

ABDEL, S. E.; ABDEL-MEGUID, I.; KORRAA, S. Markers of oxidative stress and aging in Duchene muscular dystrophy patients and the possible ameliorating effect of He:Ne laser. **Acta Myol** [S.I.], v. 26, n. 1, p. 14-21, Jul 2007.

ADHIHETTY, P. J.; IRRCHER, I.; JOSEPH, A. M.; LJUBICIC, V.; HOOD, D. A. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. **Exp Physiol** [S.I.], v. 88, n. 1, p. 99-107, Jan 2003.

ALBUQUERQUE-PONTES, G. M.; VIEIRA, R. D.; TOMAZONI, S. S.; CAIRES, C. O.; NEMETH, V.; VANIN, A. A.; SANTOS, L. A.; PINTO, H. D.; MARCOS, R. L.; BJORDAL, J. M.; DE CARVALHO, P. D.; LEAL-JUNIOR, E. C. Effect of pre-irradiation with different doses, wavelengths, and application intervals of low-level laser therapy on cytochrome c oxidase activity in intact skeletal muscle of rats. **Lasers Med Sci** [S.I.], Jun 24 2014.

ALLEN, D. G.; LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. **Physiol Rev** [S.I.], v. 88, n. 1, p. 287-332, Jan 2008.

ANTONIALLI, F. C.; DE MARCHI, T.; TOMAZONI, S. S.; VANIN, A. A.; DOS SANTOS GRANDINETTI, V.; DE PAIVA, P. R.; PINTO, H. D.; MIRANDA, E. F.; DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO, P.; LEAL-JUNIOR, E. C. Phototherapy in skeletal muscle performance and recovery after exercise: effect of combination of super-pulsed laser and light-emitting diodes. **Lasers Med Sci** [S.I.], Jun 19 2014.

AQUINO, A. E., JR.; SENE-FIORESE, M.; PAOLILLO, F. R.; DUARTE, F. O.; OISHI, J. C.; PENA, A. A., JR.; DUARTE, A. C.; HAMBLIN, M. R.; BAGNATO, V. S.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (LLLT) combined with swimming training improved the lipid profile in rats fed with high-fat diet. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 28, n. 5, p. 1271-80, Sep 2013.

ARENA, R.; TEVALD, M.; PEBERDY, M. A.; TURNER, T. Prognostic value of phase 1 of oxygen uptake on-kinetics response in the heart failure population: a pilot study. **J Cardiopulm Rehabil** [S.I.], v. 24, n. 6, p. 401-4, Nov-Dec 2004.

ASSIS, L.; MORETTI, A. I.; ABRAHAO, T. B.; DE SOUZA, H. P.; HAMBLIN, M. R.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Med Sci** [S.I.], Aug 17 2012.

BAIRAKTARI, E.; SEFERIADIS, K.; LIAMIS, G.; PSIHOGIOS, N.; TSOLAS, O.; ELISAF, M. Rhabdomyolysis-related renal tubular damage studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. **Clin Chem** [S.I.], v. 48, n. 7, p. 1106-9, Jul 2002.

BAKEEVA, L. E.; MANTEIFEL, V. M.; RODICHEV, E. B.; KARU, T. I. [Formation of gigantic mitochondria in human blood lymphocytes under the effect of an He-Ne laser]. **Mol Biol (Mosk)** [S.I.], v. 27, n. 3, p. 608-17, May-Jun 1993.

- BALADY, G. J.; ARENA, R.; SIETSEMA, K.; MYERS, J.; COKE, L.; FLETCHER, G. F.; FORMAN, D.; FRANKLIN, B.; GUAZZI, M.; GULATI, M.; KETEYIAN, S. J.; LAVIE, C. J.; MACKO, R.; MANCINI, D.; MILANI, R. V. Clinician's Guide to cardiopulmonary exercise testing in adults: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation** [S.I.], v. 122, n. 2, p. 191-225, Jul 13 2010.
- BANERJEE, A. K.; MANDAL, A.; CHANDA, D.; CHAKRABORTI, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Mol Cell Biochem** [S.I.], v. 253, n. 1-2, p. 307-12, Nov 2003.
- BARONI, B. M.; LEAL JUNIOR, E. C.; DE MARCHI, T.; LOPES, A. L.; SALVADOR, M.; VAZ, M. A. Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. **Eur J Appl Physiol** [S.I.], v. 110, n. 4, p. 789-96, Nov 2010a.
- BARONI, B. M.; LEAL JUNIOR, E. C.; GEREMIA, J. M.; DIEFENTHAELER, F.; VAZ, M. A. Effect of light-emitting diodes therapy (LEDT) on knee extensor muscle fatigue. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 28, n. 5, p. 653-8, Oct 2010b.
- BARSTOW, T. J. Characterization of VO₂ kinetics during heavy exercise. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 26, n. 11, p. 1327-34, Nov 1994.
- BARSTOW, T. J.; CASABURI, R.; WASSERMAN, K. O₂ uptake kinetics and the O₂ deficit as related to exercise intensity and blood lactate. **J Appl Physiol** [S.I.], v. 75, n. 2, p. 755-62, Aug 1993.
- BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochim Biophys Acta** [S.I.], v. 1448, n. 3, p. 372-80, Jan 11 1999.
- BERTOLIN, G.; FERRANDO-MIGUEL, R.; JACOUPY, M.; TRAVER, S.; GRENIER, K.; GREENE, A. W.; DAUPHIN, A.; WAHARTE, F.; BAYOT, A.; SALAMERO, J.; LOMBES, A.; BULTEAU, A. L.; FON, E. A.; BRICE, A.; CORTI, O. The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance. **Autophagy** [S.I.], v. 9, n. 11, p. 1801-17, Nov 1 2013.
- BIBIKOVA, A.; ORON, U. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Lasers Surg Med** [S.I.], v. 14, n. 4, p. 355-61, 1994.
- BODINE, S. C. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 38, n. 11, p. 1950-7, Nov 2006.
- BORGES, L. S.; CERQUEIRA, M. S.; DOS SANTOS ROCHA, J. A.; CONRADO, L. A.; MACHADO, M.; PEREIRA, R.; NETO, O. P. Light-emitting diode phototherapy improves muscle recovery after a damaging exercise. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 29, n. 3, p. 1139-44, May 2014.
- BORRANI, F.; CANDAU, R.; MILLET, G. Y.; PERREY, S.; FUCHSLOCHER, J.; ROUILLON, J. D. Is the VO₂ slow component dependent on progressive recruitment of

fast-twitch fibers in trained runners? **J Appl Physiol** [S.I.], v. 90, n. 6, p. 2212-20, Jun 2001.

BORSA, P. A.; LARKIN, K. A.; TRUE, J. M. Does phototherapy enhance skeletal muscle contractile function and postexercise recovery? A systematic review. **J Athl Train** [S.I.], v. 48, n. 1, p. 57-67, Jan-Feb 2013.

BRAY, M. S.; HAGBERG, J. M.; PERUSSE, L.; RANKINEN, T.; ROTH, S. M.; WOLFARTH, B.; BOUCHARD, C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 41, n. 1, p. 35-73, Jan 2009.

BROOKS, G. A.; DUBOUCHAUD, H.; BROWN, M.; SICURELLO, J. P.; BUTZ, C. E. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. **Proc Natl Acad Sci U S A** [S.I.], v. 96, n. 3, p. 1129-34, Feb 2 1999.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem** [S.I.], v. 55, n. 4, p. 611-22, Apr 2009.

CAMARGO, M. Z.; SIQUEIRA, C. P.; PRETI, M. C.; NAKAMURA, F. Y.; DE LIMA, F. M.; DIAS, I. F.; TOGINHO FILHO DDE, O.; RAMOS SDE, P. Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscle damage in rats. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 27, n. 5, p. 1051-8, Sep 2012.

CASPERSEN, C. J.; PEREIRA, M. A.; CURRAN, K. M. Changes in physical activity patterns in the United States, by sex and cross-sectional age. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 32, n. 9, p. 1601-9, Sep 2000.

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev** [S.I.], v. 84, n. 1, p. 209-38, Jan 2004.

CHEN, J. C.; GOLDHAMER, D. J. Skeletal muscle stem cells. **Reprod Biol Endocrinol** [S.I.], v. 1, p. 101, Nov 13 2003.

CHOW, R. T.; JOHNSON, M. I.; LOPES-MARTINS, R. A.; BJORDAL, J. M. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. **Lancet** [S.I.], v. 374, n. 9705, p. 1897-908, Dec 5 2009.

COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports Med** [S.I.], v. 37, n. 9, p. 737-63, 2007.

CORAZZA, A. V.; PAOLILLO, F. R.; GROPPA, F. C.; BAGNATO, V. S.; CARIA, P. H. Phototherapy and resistance training prevent sarcopenia in ovariectomized rats. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 28, n. 6, p. 1467-74, Nov 2013.

DA COSTA SANTOS, V. B.; DE PAULA RAMOS, S.; MILANEZ, V. F.; CORREA, J. C.; DE ANDRADE ALVES, R. I.; DIAS, I. F.; NAKAMURA, F. Y. LED therapy or

cryotherapy between exercise intervals in Wistar rats: anti-inflammatory and ergogenic effects. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 29, n. 2, p. 599-605, Mar 2014.

DA SILVA ALVES, M. A.; PINFILDI, C. E.; NETO, L. N.; LOURENCO, R. P.; DE AZEVEDO, P. H.; DOURADO, V. Z. Acute effects of low-level laser therapy on physiologic and electromyographic responses to the cardiopulmonary exercise testing in healthy untrained adults. **Lasers Med Sci** [S.I.], Jun 13 2014.

DAWN T. GULICK, J.; CHIAPPA, R. J.; KEVIN R. CROWLEY, M. E. S.; WESCOTT, S. R. Predicting 1-RM isotonic knee extension strength utilizing isokinetic dynamometry. **Isokinetics and Exercise Science** [S.I.], v. 7, p. 145-149, 1998/1999.

DE ALMEIDA, P.; LOPES-MARTINS, R. A.; DE MARCHI, T.; TOMAZONI, S. S.; ALBERTINI, R.; CORREA, J. C.; ROSSI, R. P.; MACHADO, G. P.; DA SILVA, D. P.; BJORDAL, J. M.; LEAL JUNIOR, E. C. Red (660 nm) and infrared (830 nm) low-level laser therapy in skeletal muscle fatigue in humans: what is better? **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 27, n. 2, p. 453-8, Mar 2012.

DE ALMEIDA, P.; LOPES-MARTINS, R. A.; TOMAZONI, S. S.; SILVA, J. A., JR.; DE CARVALHO PDE, T.; BJORDAL, J. M.; LEAL JUNIOR, E. C. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. **Photochem Photobiol** [S.I.], v. 87, n. 5, p. 1159-63, Sep-Oct 2011.

DE JONGE, H. J.; FEHRMANN, R. S.; DE BONT, E. S.; HOFSTRA, R. M.; GERBENS, F.; KAMPS, W. A.; DE VRIES, E. G.; VAN DER ZEE, A. G.; TE MEERMAN, G. J.; TER ELST, A. Evidence based selection of housekeeping genes. **PLoS One** [S.I.], v. 2, n. 9, p. e898, 2007.

DE MARCHI, T.; LEAL JUNIOR, E. C.; BORTOLI, C.; TOMAZONI, S. S.; LOPES-MARTINS, R. A.; SALVADOR, M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers Med Sci** [S.I.], Jul 8 2011.

DE MARCHI, T.; LEAL JUNIOR, E. C.; BORTOLI, C.; TOMAZONI, S. S.; LOPES-MARTINS, R. A.; SALVADOR, M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 27, n. 1, p. 231-6, Jan 2012.

DE SOUZA, T. O.; MESQUITA, D. A.; FERRARI, R. A.; DOS SANTOS PINTO, D., JR.; CORREA, L.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P.; MARTINS, M. D. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 26, n. 6, p. 803-14, Nov 2011.

DENIS, R.; O'BRIEN, C.; DELAHUNT, E. The effects of light emitting diode therapy following high intensity exercise. **Phys Ther Sport** [S.I.], v. 14, n. 2, p. 110-5, May 2013.

DOS REIS, F. A.; DA SILVA, B. A.; LARAIA, E. M.; DE MELO, R. M.; SILVA, P. H.; LEAL-JUNIOR, E. C.; DE CARVALHO PDE, T. Effects of pre- or post-exercise low-level laser therapy (830 nm) on skeletal muscle fatigue and biochemical markers of

recovery in humans: double-blind placebo-controlled trial. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 32, n. 2, p. 106-12, Feb 2014.

DOS SANTOS MACIEL, T.; MUNOZ, I. S.; NICOLAU, R. A.; NOGUEIRA, D. V.; HAUCK, L. A.; OSORIO, R. A.; DE PAULA JUNIOR, A. R. Phototherapy effect on the muscular activity of regular physical activity practitioners. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 29, n. 3, p. 1145-52, May 2014.

DOURADO, D. M.; FAVERO, S.; MATIAS, R.; CARVALHO PDE, T.; DA CRUZ-HOFLING, M. A. Low-level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in endothelial and nonendothelial cells of mice gastrocnemius exposed to snake venom. **Photochem Photobiol** [S.I.], v. 87, n. 2, p. 418-26, Mar-Apr 2011.

DOURIS, P.; SOUTHARD, V.; FERRIGI, R.; GRAUER, J.; KATZ, D.; NASCIMENTO, C.; PODBIELSKI, P. Effect of phototherapy on delayed onset muscle soreness. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 24, n. 3, p. 377-82, Jun 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. **Nature** [S.I.], v. 168, p. 167-167, 1951.

ENEA, C.; SEGUIN, F.; PETITPAS-MULLIEZ, J.; BOILDIEU, N.; BOISSEAU, N.; DELPECH, N.; DIAZ, V.; EUGENE, M.; DUGUE, B. (1)H NMR-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after acute and chronic physical exercise. **Anal Bioanal Chem** [S.I.], v. 396, n. 3, p. 1167-76, Feb 2010.

ENOKA, R. M. Muscle fatigue - from motor units to clinical symptoms. **J Biomech** [S.I.], v. 45, n. 3, p. 427-33, Feb 2 2012.

ENWEMEKA, C. S. Light is light. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 23, n. 2, p. 159-60, Apr 2005.

ENWEMEKA, C. S. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 27, n. 3, p. 387-93, Jun 2009.

ENWEMEKA, C. S.; PARKER, J. C.; DOWDY, D. S.; HARKNESS, E. E.; SANFORD, L. E.; WOODRUFF, L. D. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 22, n. 4, p. 323-9, Aug 2004.

FAISAL, A.; BEAVERS, K. R.; HUGHSON, R. L. O₂ uptake and blood pressure regulation at the onset of exercise: interaction of circadian rhythm and priming exercise. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** [S.I.], v. 299, n. 6, p. H1832-42, Dec 2010.

FAVIER, F. B.; BENOIT, H.; FREYSSENET, D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. **Pflugers Arch** [S.I.], v. 456, n. 3, p. 587-600, Jun 2008.

FELISMINO, A. S.; COSTA, E. C.; AOKI, M. S.; FERRARESI, C.; DE ARAUJO MOURA LEMOS, T. M.; DE BRITO VIEIRA, W. H. Effect of low-level laser therapy

(808 nm) on markers of muscle damage: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 29, n. 3, p. 933-8, May 2014.

FERRARESI, C.; DE BRITO OLIVEIRA, T.; DE OLIVEIRA ZAFALON, L.; DE MENEZES REIFF, R. B.; BALDISSERA, V.; DE ANDRADE PEREZ, S. E.; MATHEUCCI JUNIOR, E.; PARIZOTTO, N. A. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 26, n. 3, p. 349-58, May 2011.

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

FERRARESI, C.; PANEPUCCI, R.; REIFF, R.; JÚNIOR, E.; BAGNATO, V.; PARIZOTTO, N. Molecular effects of low-level laser therapy (808 nm) on human muscle performance. **Physical Therapy in Sport** [S.I.], v. 13, n. 3, p. e5, 2012.

FERRARESI, C.; PARIZOTTO, N. A. Low-Level Laser Therapy and Light-Emitting Diode Therapy on Muscle Tissue: Performance, Fatigue, and Repair. *Handbook of Photomedicine*. Taylor & Francis, 2013. p. 611-630.

FERRARESI, C.; PARIZOTTO, N. A.; PIRES DE SOUSA, M. V.; KAIPPERT, B.; HUANG, Y.-Y.; KOISO, T.; BAGNATO, V. S.; HAMBLIN, M. R. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. **Journal of Biophotonics** [S.I.], v. 9999, n. 9999, p. n/a-n/a, 2014.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. **Sports Med** [S.I.], v. 36, n. 4, p. 327-58, 2006.

FLUCK, M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. **J Exp Biol** [S.I.], v. 209, n. Pt 12, p. 2239-48, Jun 2006.

FOLLAND, J. P.; WILLIAMS, A. G. The adaptations to strength training : morphological and neurological contributions to increased strength. **Sports Med** [S.I.], v. 37, n. 2, p. 145-68, 2007.

FRY, A. C. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. **Sports Med** [S.I.], v. 34, n. 10, p. 663-79, 2004.

FULOP, A. M.; DHIMMER, S.; DELUCA, J. R.; JOHANSON, D. D.; LENZ, R. V.; PATEL, K. B.; DOURIS, P. C.; ENWEMEKA, C. S. A meta-analysis of the efficacy of phototherapy in tissue repair. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 27, n. 5, p. 695-702, Oct 2009.

GAESSER, G. A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exerc Sport Sci Rev** [S.I.], v. 24, p. 35-71, 1996.

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J Biomed Sci** [S.I.], v. 16, p. 4, 2009.

GIULIANI, A.; LORENZINI, L.; GALLAMINI, M.; MASSELLA, A.; GIARDINO, L.; CALZA, L. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. **BMC Complement Altern Med** [S.I.], v. 9, p. 8, 2009.

GLASS, D. J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nat Cell Biol** [S.I.], v. 5, n. 2, p. 87-90, Feb 2003.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol** [S.I.], v. 37, n. 10, p. 1974-84, Oct 2005.

GORGEY, A. S.; WADEE, A. N.; SOBHI, N. N. The effect of low-level laser therapy on electrically induced muscle fatigue: a pilot study. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 26, n. 5, p. 501-6, Oct 2008.

GUPTA, A.; AVCI, P.; SADASIVAM, M.; CHANDRAN, R.; PARIZOTTO, N.; VECCHIO, D.; DE MELO, W. C.; DAI, T.; CHIANG, L. Y.; HAMBLIN, M. R. Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. **Biotechnol Adv** [S.I.], Aug 21 2012.

HARRIDGE, S. D. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. **Exp Physiol** [S.I.], v. 92, n. 5, p. 783-97, Sep 2007.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol** [S.I.], v. 91, n. 2, p. 534-51, Aug 2001.

HAWLEY, J. A. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? **Appl Physiol Nutr Metab** [S.I.], v. 34, n. 3, p. 355-61, Jun 2009.

HAYWORTH, C. R.; ROJAS, J. C.; PADILLA, E.; HOLMES, G. M.; SHERIDAN, E. C.; GONZALEZ-LIMA, F. In vivo low-level light therapy increases cytochrome oxidase in skeletal muscle. **Photochem Photobiol** [S.I.], v. 86, n. 3, p. 673-80, May-Jun 2010.

HEPPLE, R. T. The role of O₂ supply in muscle fatigue. **Can J Appl Physiol** [S.I.], v. 27, n. 1, p. 56-69, Feb 2002.

HIGASHI, R. H.; TOMA, R. L.; TUCCI, H. T.; PEDRONI, C. R.; FERREIRA, P. D.; BALDINI, G.; AVEIRO, M. C.; BORGHI-SILVA, A.; DE OLIVEIRA, A. S.; RENNO, A. C. Effects of low-level laser therapy on biceps braquialis muscle fatigue in young women. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 31, n. 12, p. 586-94, Dec 2013.

HODSON-TOLE, E. F.; WAKELING, J. M. Motor unit recruitment for dynamic tasks: current understanding and future directions. **J Comp Physiol B** [S.I.], v. 179, n. 1, p. 57-66, Jan 2009.

HOFFMAN, J. R.; KRAEMER, W. J.; BHASIN, S.; STORER, T.; RATAMESS, N. A.; HAFF, G. G.; WILLOUGHBY, D. S.; ROGOL, A. D. Position stand on androgen and human growth hormone use. **J Strength Cond Res** [S.I.], v. 23, n. 5 Suppl, p. S1-S59, Aug 2009.

- HOLTERMAN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. **Semin Cell Dev Biol** [S.I.], v. 16, n. 4-5, p. 575-84, Aug-Oct 2005.
- HORNERY, D. J.; FARROW, D.; MUJIK, I.; YOUNG, W. An integrated physiological and performance profile of professional tennis. **Br J Sports Med** [S.I.], v. 41, n. 8, p. 531-6; discussion 536, Aug 2007.
- HOURELD, N. N.; MASHA, R. T.; ABRAHAMSE, H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates cytochrome c oxidase in stressed fibroblast cells. **Lasers Surg Med** [S.I.], Apr 5 2012.
- HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response** [S.I.], v. 7, n. 4, p. 358-83, 2009.
- HUANG, Y. Y.; SHARMA, S. K.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose Response** [S.I.], v. 9, n. 4, p. 602-18, 2011.
- HUGHSON, R. L.; CUERVO, L. A.; PATLA, A. E.; WINTER, D. A.; XING, H. C.; DIETRICH, B. H.; SWANSON, G. D. Time domain analysis of oxygen uptake during pseudorandom binary sequence exercise tests. **J Appl Physiol** (1985) [S.I.], v. 71, n. 4, p. 1620-6, Oct 1991.
- HUGHSON, R. L.; SHERRILL, D. L.; SWANSON, G. D. Kinetics of VO₂ with impulse and step exercise in humans. **J Appl Physiol** (1985) [S.I.], v. 64, n. 1, p. 451-9, Jan 1988.
- HUGHSON, R. L.; WINTER, D. A.; PATLA, A. E.; SWANSON, G. D.; CUERVO, L. A. Investigation of VO₂ kinetics in humans with pseudorandom binary sequence work rate change. **J Appl Physiol** (1985) [S.I.], v. 68, n. 2, p. 796-801, Feb 1990.
- HUIKESHOVEN, M.; KOSTER, P. H.; DE BORGIE, C. A.; BEEK, J. F.; VAN GEMERT, M. J.; VAN DER HORST, C. M. Redarkening of port-wine stains 10 years after pulsed-dye-laser treatment. **N Engl J Med** [S.I.], v. 356, n. 12, p. 1235-40, Mar 22 2007.
- IBRAHIMI, O. A.; SAKAMOTO, F. H.; ANDERSON, R. R. Picosecond laser pulses for tattoo removal: a good, old idea. **JAMA Dermatol** [S.I.], v. 149, n. 2, p. 241, Feb 2013.
- IRVING, B. A.; RUTKOWSKI, J.; BROCK, D. W.; DAVIS, C. K.; BARRETT, E. J.; GAESSER, G. A.; WELTMAN, A. Comparison of Borg- and OMNI-RPE as markers of the blood lactate response to exercise. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 38, n. 7, p. 1348-52, Jul 2006.
- JARVINEN, T. A.; JARVINEN, T. L.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Med** [S.I.], v. 33, n. 5, p. 745-64, May 2005.

JONES, A. M.; GRASSI, B.; CHRISTENSEN, P. M.; KRUSTRUP, P.; BANGSBO, J.; POOLE, D. C. Slow component of V.O kinetics: mechanistic bases and practical applications. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 43, n. 11, p. 2046-62, Nov 2011.

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

KARU, T. Is it time to consider photobiomodulation as a drug equivalent? **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 31, n. 5, p. 189-91, May 2013.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B** [S.I.], v. 27, n. 3, p. 219-23, Mar 1995.

KARU, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol** [S.I.], v. 84, n. 5, p. 1091-9, Sep-Oct 2008.

KARU, T. I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **IUBMB Life** [S.I.], v. 62, n. 8, p. 607-10, Aug 2010.

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 23, n. 4, p. 355-61, Aug 2005.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. **Photochem Photobiol** [S.I.], v. 80, n. 2, p. 366-72, Sep-Oct 2004.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surg Med** [S.I.], v. 36, n. 4, p. 307-14, Apr 2005.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. **Photochem Photobiol Sci** [S.I.], v. 3, n. 2, p. 211-6, Feb 2004.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KOLYAKOV, S. F.; AFANASYEVA, N. I. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8 nm. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 26, n. 6, p. 593-9, Dec 2008.

KELENCZ, C. A.; MUNOZ, I. S.; AMORIM, C. F.; NICOLAU, R. A. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium noncoherent light (640 nm) on muscle activity: a clinical study. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 28, n. 5, p. 647-52, Oct 2010.

KHAN, H. A. Bioluminometric assay of ATP in mouse brain: Determinant factors for enhanced test sensitivity. **J Biosci** [S.I.], v. 28, n. 4, p. 379-82, Jun 2003.

KUANG, S.; RUDNICKI, M. A. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. **Trends Mol Med** [S.I.], v. 14, n. 2, p. 82-91, Feb 2008.

LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. **J Physiol** [S.I.], v. 589, n. Pt 9, p. 2119-27, May 1 2011.

LEAL-JUNIOR, E. C.; DE ALMEIDA, P.; TOMAZONI, S. S.; DE CARVALHO PDE, T.; LOPES-MARTINS, R. A.; FRIGO, L.; JOENSEN, J.; JOHNSON, M. I.; BJORDAL, J. M. Superpulsed Low-Level Laser Therapy Protects Skeletal Muscle of mdx Mice against Damage, Inflammation and Morphological Changes Delaying Dystrophy Progression. **PLoS One** [S.I.], v. 9, n. 3, p. e89453, 2014.

LEAL-JUNIOR, E. C.; VANIN, A. A.; MIRANDA, E. F.; DE CARVALHO, P. D.; DAL CORSO, S.; BJORDAL, J. M. 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** [S.I.], Nov 19 2013.

LEAL JUNIOR, E. C.; DE GODOI, V.; MANCALOSSO, J. L.; ROSSI, R. P.; DE MARCHI, T.; PARENTE, M.; GROSSELLI, D.; GENEROSI, R. A.; BASSO, M.; FRIGO, L.; TOMAZONI, S. S.; BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R. A. Comparison between cold water immersion therapy (CWIT) and light emitting diode therapy (LEDT) in short-term skeletal muscle recovery after high-intensity exercise in athletes--preliminary results. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 26, n. 4, p. 493-501, Jul 2011.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; BARONI, B. M.; DE MARCHI, T.; ROSSI, R. P.; GROSSELLI, D.; GENEROSI, R. A.; DE GODOI, V.; BASSO, M.; MANCALOSSO, J. L.; BJORDAL, J. M. Comparison between single-diode low-level laser therapy (LLLT) and LED multi-diode (cluster) therapy (LEDT) applications before high-intensity exercise. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 27, n. 4, p. 617-23, Aug 2009a.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; BARONI, B. M.; DE MARCHI, T.; TAUFER, D.; MANFRO, D. S.; RECH, M.; DANNA, V.; GROSSELLI, D.; GENEROSI, R. A.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; BJORDAL, J. M. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 24, n. 6, p. 857-63, Nov 2009b.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; DALAN, F.; FERRARI, M.; SBABO, F. M.; GENEROSI, R. A.; BARONI, B. M.; PENNA, S. C.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of 655-nm low-level laser therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 26, n. 5, p. 419-24, Oct 2008.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; DE ALMEIDA, P.; RAMOS, L.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **Eur J Appl Physiol** [S.I.], v. 108, n. 6, p. 1083-8, Apr 2010a.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; FRIGO, L.; DE MARCHI, T.; ROSSI, R. P.; DE GODOI, V.; TOMAZONI, S. S.; SILVA, D. P.; BASSO, M.; FILHO, P. L.; DE VALLS CORSETTI, F.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise-induced skeletal

muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. **J Orthop Sports Phys Ther** [S.I.], v. 40, n. 8, p. 524-32, Aug 2010b.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; ROSSI, R. P.; DE MARCHI, T.; BARONI, B. M.; DE GODOI, V.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; BJORDAL, J. M. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. **Lasers Surg Med** [S.I.], v. 41, n. 8, p. 572-7, Oct 2009c.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; VANIN, A. A.; BARONI, B. M.; GROSSELLI, D.; DE MARCHI, T.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 24, n. 3, p. 425-31, May 2009d.

LEE, S.; BARTON, E. R.; SWEENEY, H. L.; FARRAR, R. P. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **J Appl Physiol (1985)** [S.I.], v. 96, n. 3, p. 1097-104, Mar 2004.

LIU, X. G.; ZHOU, Y. J.; LIU, T. C.; YUAN, J. Q. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 27, n. 6, p. 863-9, Dec 2009.

LIU, Y.; SCHLUMBERGER, A.; WIRTH, K.; SCHMIDTBLEICHER, D.; STEINACKER, J. M. Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training. **J Appl Physiol** [S.I.], v. 94, n. 6, p. 2282-8, Jun 2003.

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

LOPES-MARTINS, R. A.; MARCOS, R. L.; LEONARDO, P. S.; PRIANTI, A. C., JR.; MUSCARA, M. N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol (1985)** [S.I.], v. 101, n. 1, p. 283-8, Jul 2006.

LOSON, O. C.; SONG, Z.; CHEN, H.; CHAN, D. C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. **Mol Biol Cell** [S.I.], v. 24, n. 5, p. 659-67, Mar 2013.

LUO, L.; SUN, Z.; ZHANG, L.; LI, X.; DONG, Y.; LIU, T. C. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF-beta1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci** [S.I.], Jun 20 2012.

LUO, L.; SUN, Z.; ZHANG, L.; LI, X.; DONG, Y.; LIU, T. C. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF-beta1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 28, n. 3, p. 725-34, May 2013.

MAK, M. C.; CHEING, G. L. Immediate effects of monochromatic infrared energy on microcirculation in healthy subjects. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 30, n. 4, p. 193-9, Apr 2012.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **J Photochem Photobiol B** [S.I.], v. 38, n. 1, p. 25-30, Mar 1997.

MANTEIFEL, V. M.; KARU, T. I. [Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in subsequent generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light]. **Izv Akad Nauk Ser Biol** [S.I.], n. 6, p. 672-83, Nov-Dec 2005.

MANZUR, A. Y.; MUNTONI, F. Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** [S.I.], v. 80, n. 7, p. 706-14, Jul 2009.

MARKERT, C. D.; AMBROSIO, F.; CALL, J. A.; GRANGE, R. W. Exercise and Duchenne muscular dystrophy: toward evidence-based exercise prescription. **Muscle Nerve** [S.I.], v. 43, n. 4, p. 464-78, Apr 2011.

MASHA, R. T.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates transcription of genes involved in the electron transport chain. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 31, n. 2, p. 47-53, Feb 2013.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol** [S.I.], v. 9, p. 493-5, Feb 1961.

MCCARTHY, J. J. Out FoxO'd by microRNA. Focus on "miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle". **Am J Physiol Cell Physiol** [S.I.], v. 307, n. 4, p. C311-3, Aug 15 2014.

MESQUITA-FERRARI, R. A.; MARTINS, M. D.; SILVA, J. A., JR.; DA SILVA, T. D.; PIOVESAN, R. F.; PAVESI, V. C.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 26, n. 3, p. 335-40, May 2011.

MIAH, A. *Genetically modified athletes: Biomedical ethics, gene doping and sport*. Routledge, 2004.

NAKANO, J.; KATAOKA, H.; SAKAMOTO, J.; ORIGUCHI, T.; OKITA, M.; YOSHIMURA, T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. **Exp Physiol** [S.I.], v. 94, n. 9, p. 1005-15, Sep 2009.

NEUBAUER, O.; SABAPATHY, S.; LAZARUS, R.; JOWETT, J. B.; DESBROW, B.; PEAKE, J. M.; CAMERON-SMITH, D.; HASELER, L. J.; WAGNER, K. H.; BULMER, A. C. Transcriptome analysis of neutrophils after endurance exercise reveals novel signaling mechanisms in the immune response to physiological stress. **J Appl Physiol** [S.I.], v. 114, n. 12, p. 1677-88, Jun 15 2013.

NIELSEN, O. B.; DE PAOLI, F. V. Regulation of Na⁺-K⁺ homeostasis and excitability in contracting muscles: implications for fatigue. **Appl Physiol Nutr Metab** [S.I.], v. 32, n. 5, p. 974-84, Oct 2007.

ORON, U.; ILIC, S.; DE TABOADA, L.; STREETER, J. Ga-As (808 nm) laser irradiation enhances ATP production in human neuronal cells in culture. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 25, n. 3, p. 180-2, Jun 2007.

PANEPUCCI, R. A.; OLIVEIRA, L. H.; ZANETTE, D. L.; VIU CARRARA RDE, C.; ARAUJO, A. G.; ORELLANA, M. D.; BONINI DE PALMA, P. V.; MENEZES, C. C.; COVAS, D. T.; ZAGO, M. A. Increased levels of NOTCH1, NF-kappaB, and other interconnected transcription factors characterize primitive sets of hematopoietic stem cells. **Stem Cells Dev** [S.I.], v. 19, n. 3, p. 321-32, Mar 2010.

PAOLILLO, F. R.; CORAZZA, A. V.; BORGHI-SILVA, A.; PARIZOTTO, N. A.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Infrared LED irradiation applied during high-intensity treadmill training improves maximal exercise tolerance in postmenopausal women: a 6-month longitudinal study. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 28, n. 2, p. 415-22, Feb 2013.

PAOLILLO, F. R.; MILAN, J. C.; ANICETO, I. V.; BARRETO, S. G.; REBELATTO, J. R.; BORGHI-SILVA, A.; PARIZOTTO, N. A.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Effects of infrared-LED illumination applied during high-intensity treadmill training in postmenopausal women. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 29, n. 9, p. 639-45, Sep 2011.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I. M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Lett** [S.I.], v. 175, n. 1, p. 95-9, Sep 17 1984.

PATROCINIO, T.; SARDIM, A. C.; ASSIS, L.; FERNANDES, K. R.; RODRIGUES, N.; RENNO, A. C. Effect of low-level laser therapy (808 nm) in skeletal muscle after resistance exercise training in rats. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 31, n. 10, p. 492-8, Oct 2013.

PECHLIVANIS, A.; KOSTIDIS, S.; SARASLANIDIS, P.; PETRIDOU, A.; TSALIS, G.; MOUGIOS, V.; GIKA, H. G.; MIKROS, E.; THEODORIDIS, G. A. (1)H NMR-based metabonomic investigation of the effect of two different exercise sessions on the metabolic fingerprint of human urine. **J Proteome Res** [S.I.], v. 9, n. 12, p. 6405-16, Dec 3 2010.

PEPLOW, P. V.; BAXTER, G. D. Testing infrared laser phototherapy (810 nm) to ameliorate diabetes: irradiation on body parts of diabetic mice. **Lasers Surg Med** [S.I.], v. 45, n. 4, p. 240-5, Apr 2013.

PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; BARBIERI, J.; BROWN, E. B.; GELBARD, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **Biotechniques** [S.I.], v. 50, n. 2, p. 98-115, Feb 2011.

PERUSSE, L.; RANKINEN, T.; HAGBERG, J. M.; LOOS, R. J.; ROTH, S. M.; SARZYNSKI, M. A.; WOLFARTH, B.; BOUCHARD, C. Advances in exercise,

fitness, and performance genomics in 2012. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 45, n. 5, p. 824-31, May 2013.

PETRELLA, J. K.; KIM, J. S.; MAYHEW, D. L.; CROSS, J. M.; BAMMAN, M. M. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. **J Appl Physiol** [S.I.], v. 104, n. 6, p. 1736-42, Jun 2008.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev** [S.I.], v. 88, n. 4, p. 1243-76, Oct 2008.

RATAMESS, N. A.; ALVAR, B. A.; KIBLER, W. B.; KRAEMER, W. J.; TRIPLETT, N. T. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009.

RENNO, A. C.; TOMA, R. L.; FEITOSA, S. M.; FERNANDES, K.; BOSSINI, P. S.; DE OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.; RIBEIRO, D. A. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 29, n. 1, p. 5-10, Jan 2011.

RIZZI, C. F.; MAURIZ, J. L.; FREITAS CORREA, D. S.; MOREIRA, A. J.; ZETTLER, C. G.; FILIPPIN, L. I.; MARRONI, N. P.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers Surg Med** [S.I.], v. 38, n. 7, p. 704-13, Aug 2006.

ROSENBAUM, S.; RINGSEIS, R.; MOST, E.; HILLEN, S.; BECKER, S.; ERHARDT, G.; REINER, G.; EDER, K. Genes involved in carnitine synthesis and carnitine uptake are up-regulated in the liver of sows during lactation. **Acta Vet Scand** [S.I.], v. 55, p. 24, 2013.

ROSS, R.; RISSANEN, J.; PEDWELL, H.; CLIFFORD, J.; SHRAGGE, P. Influence of diet and exercise on skeletal muscle and visceral adipose tissue in men. **J Appl Physiol** (1985) [S.I.], v. 81, n. 6, p. 2445-55, Dec 1996.

ROSSITER, H. B.; WARD, S. A.; DOYLE, V. L.; HOWE, F. A.; GRIFFITHS, J. R.; WHIPP, B. J. Inferences from pulmonary O₂ uptake with respect to intramuscular [phosphocreatine] kinetics during moderate exercise in humans. **J Physiol** [S.I.], v. 518 (Pt 3), p. 921-32, Aug 1 1999.

ROTH, D.; ORON, U. Repair mechanisms involved in muscle regeneration following partial excision of the rat gastrocnemius muscle. **Exp Cell Biol** [S.I.], v. 53, n. 2, p. 107-14, 1985.

SAHLIN, K.; MOGENSEN, M.; BAGGER, M.; FERNSTROM, M.; PEDERSEN, P. K. The potential for mitochondrial fat oxidation in human skeletal muscle influences whole body fat oxidation during low-intensity exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab** [S.I.], v. 292, n. 1, p. E223-30, Jan 2007.

SANTOS, L. A.; MARCOS, R. L.; TOMAZONI, S. S.; VANIN, A. A.; ANTONIALLI, F. C.; GRANDINETTI, V. D.; ALBUQUERQUE-PONTES, G. M.; DE PAIVA, P. R.; LOPES-MARTINS, R. A.; DE CARVALHO, P. D.; BJORDAL, J. M.; LEAL-JUNIOR, E. C. Effects of pre-irradiation of low-level laser therapy with different doses and wavelengths in skeletal muscle performance, fatigue, and skeletal muscle damage induced by tetanic contractions in rats. **Lasers Med Sci** [S.I.], Mar 21 2014.

SCHILLING, B. K.; FRY, A. C.; CHIU, L. Z.; WEISS, L. W. Myosin heavy chain isoform expression and in vivo isometric performance: a regression model. **J Strength Cond Res** [S.I.], v. 19, n. 2, p. 270-5, May 2005.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc** [S.I.], v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008.

SCHUELKE, M.; WAGNER, K. R.; STOLZ, L. E.; HUBNER, C.; RIEBEL, T.; KOMEN, W.; BRAUN, T.; TOBIN, J. F.; LEE, S. J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **N Engl J Med** [S.I.], v. 350, n. 26, p. 2682-8, Jun 24 2004.

SCHUENKE, M. D.; KOPCHICK, J. J.; HIKIDA, R. S.; KRAEMER, W. J.; STARON, R. S. Effects of growth hormone overexpression vs. growth hormone receptor gene disruption on mouse hindlimb muscle fiber type composition. **Growth Horm IGF Res** [S.I.], v. 18, n. 6, p. 479-86, Dec 2008.

SHEFER, G.; BARASH, I.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. **Biochim Biophys Acta** [S.I.], v. 1593, n. 2-3, p. 131-9, Feb 17 2003.

SHEFER, G.; PARTRIDGE, T. A.; HESLOP, L.; GROSS, J. G.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci** [S.I.], v. 115, n. Pt 7, p. 1461-9, Apr 1 2002.

SILVEIRA, P. C.; DA SILVA, L. A.; PINHO, C. A.; DE SOUZA, P. S.; RONSANI, M. M.; SCHEFFER DDA, L.; PINHO, R. A. Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 28, n. 2, p. 431-6, Feb 2013.

SILVEIRA, P. C.; SILVA, L. A.; FRAGA, D. B.; FREITAS, T. P.; STRECK, E. L.; PINHO, R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol B** [S.I.], v. 95, n. 2, p. 89-92, May 4 2009.

SILVEIRA, P. C.; SILVA, L. A.; FREITAS, T. P.; LATINI, A.; PINHO, R. A. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 26, n. 1, p. 125-31, Jan 2011.

SIMÕES, R. P.; CASTELLO-SIMÕES, V.; MENDES, R. G.; ARCHIZA, B.; SANTOS, D. A.; MACHADO, H. G.; BONJORNO, J. C., JR.; OLIVEIRA, C. R.; REIS, M. S.; CATAI, A. M.; ARENA, R.; BORGHI-SILVA, A. Lactate and heart rate

variability threshold during resistance exercise in the young and elderly. **Int J Sports Med** [S.I.], v. 34, n. 11, p. 991-6, Nov 2013.

SOMMER, A. P.; ORON, U.; KAJANDER, E. O.; MESTER, A. R. Stressed cells survive better with light. **J Proteome Res** [S.I.], v. 1, n. 5, p. 475, Sep-Oct 2002.

STEPTO, N. K.; COFFEY, V. G.; CAREY, A. L.; PONNAMPALAM, A. P.; CANNY, B. J.; POWELL, D.; HAWLEY, J. A. Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 41, n. 3, p. 546-65, Mar 2009.

SUSSAI, D. A.; CARVALHO PDE, T.; DOURADO, D. M.; BELCHIOR, A. C.; DOS REIS, F. A.; PEREIRA, D. M. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 25, n. 1, p. 115-20, Jan 2010.

TANNU, N. S.; RAO, V. K.; CHAUDHARY, R. M.; GIORGIANNI, F.; SAEED, A. E.; GAO, Y.; RAGHOW, R. Comparative proteomes of the proliferating C(2)C(12) myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program. **Mol Cell Proteomics** [S.I.], v. 3, n. 11, p. 1065-82, Nov 2004.

TOMA, R. L.; TUCCI, H. T.; ANTUNES, H. K.; PEDRONI, C. R.; DE OLIVEIRA, A. S.; BUCK, I.; FERREIRA, P. D.; VASSAO, P. G.; RENNO, A. C. Effect of 808 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in elderly women. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 28, n. 5, p. 1375-82, Sep 2013.

TONKONOGLI, M.; SAHLIN, K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. **Exerc Sport Sci Rev** [S.I.], v. 30, n. 3, p. 129-37, Jul 2002.

TONKONOGLI, M.; WALSH, B.; SVENSSON, M.; SAHLIN, K. Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. **J Physiol** [S.I.], v. 528 Pt 2, p. 379-88, Oct 15 2000.

TRACY, B. L.; IVEY, F. M.; JEFFREY METTER, E.; FLEG, J. L.; SIEGEL, E. L.; HURLEY, B. F. A more efficient magnetic resonance imaging-based strategy for measuring quadriceps muscle volume. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 35, n. 3, p. 425-33, Mar 2003.

TUMILTY, S.; MUNN, J.; MCDONOUGH, S.; HURLEY, D. A.; BASFORD, J. R.; BAXTER, G. D. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 28, n. 1, p. 3-16, Feb 2010.

VAN DONGEN, J.; SLAGBOOM, P. E.; DRAISMA, H. H.; MARTIN, N. G.; BOOMSMA, D. I. The continuing value of twin studies in the omics era. **Nat Rev Genet** [S.I.], v. 13, n. 9, p. 640-53, Aug 14 2012.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** [S.I.], v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002.

VIEIRA, W.; GOES, R.; COSTA, F.; PARIZOTTO, N.; PEREZ, S.; BALDISSERA, V.; MUNIN, F.; SCHWANTES, M. Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos a treinamento aeróbio em esteira e laser de baixa intensidade. **Revista Brasileira de Fisioterapia** [S.I.], v. 10, p. 205-211, 2006.

VIEIRA, W. H.; FERRARESI, C.; PEREZ, S. E.; BALDISSERA, V.; PARIZOTTO, N. A. 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** [S.I.], v. 27, n. 2, p. 497-504, Mar 2012.

VIERCK, J.; O'REILLY, B.; HOSSNER, K.; ANTONIO, J.; BYRNE, K.; BUCCI, L.; DODSON, M. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. **Cell Biol Int** [S.I.], v. 24, n. 5, p. 263-72, 2000.

VINCK, E.; CAGNIE, B.; COOREVITS, P.; VANDERSTRAETEN, G.; CAMBIER, D. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: a pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. **Lasers Med Sci** [S.I.], v. 21, n. 1, p. 11-8, Apr 2006.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Mosc)** [S.I.], v. 69, n. 1, p. 81-90, Jan 2004.

WAWRZYNIAK, J. R.; TRACY, J. E.; CATIZONE, P. V.; STORROW, R. R. Effect of Closed Chain Exercise on Quadriceps Femoris Peak Torque and Functional Performance. **J Athl Train** [S.I.], v. 31, n. 4, p. 335-340, Oct 1996.

WEBER, J.; LAMB, D. *Statistics and research in physical education*. Saint Louis: C. V. Mosby Co., 1970.

WEISS, N.; ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat Embryol (Berl)** [S.I.], v. 186, n. 5, p. 497-503, Oct 1992.

WERNBOM, M.; AUGUSTSSON, J.; THOMEE, R. The influence of frequency, intensity, volume and mode of strength training on whole muscle cross-sectional area in humans. **Sports Med** [S.I.], v. 37, n. 3, p. 225-64, 2007.

WESTERBLAD, H.; ALLEN, D. G. Emerging roles of ROS/RNS in muscle function and fatigue. **Antioxid Redox Signal** [S.I.], v. 15, n. 9, p. 2487-99, Nov 1 2011.

WESTERBLAD, H.; BRUTON, J. D.; KATZ, A. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. **Exp Cell Res** [S.I.], v. 316, n. 18, p. 3093-9, Nov 1 2010.

WHIPP, B. J. The slow component of O₂ uptake kinetics during heavy exercise. **Med Sci Sports Exerc** [S.I.], v. 26, n. 11, p. 1319-26, Nov 1994.

WHIPP, B. J.; CASABURI, R. Characterizing O₂ uptake response kinetics during exercise. **Int J Sports Med** [S.I.], v. 3, n. 2, p. 97-9, May 1982.

WHIPP, B. J.; WARD, S. A.; LAMARRA, N.; DAVIS, J. A.; WASSERMAN, K. Parameters of ventilatory and gas exchange dynamics during exercise. **J Appl Physiol** [S.I.], v. 52, n. 6, p. 1506-13, Jun 1982.

WILBORN, C. D.; TAYLOR, L. W.; GREENWOOD, M.; KREIDER, R. B.; WILLOUGHBY, D. S. Effects of different intensities of resistance exercise on regulators of myogenesis. **J Strength Cond Res** [S.I.], v. 23, n. 8, p. 2179-87, Nov 2009.

WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C.; EISNER, R.; YOUNG, N.; GAUTAM, B.; HAU, D. D.; PSYCHOGIOS, N.; DONG, E.; BOUATRA, S.; MANDAL, R.; SINELNIKOV, I.; XIA, J.; JIA, L.; CRUZ, J. A.; LIM, E.; SOBSEY, C. A.; SHRIVASTAVA, S.; HUANG, P.; LIU, P.; FANG, L.; PENG, J.; FRADETTE, R.; CHENG, D.; TZUR, D.; CLEMENTS, M.; LEWIS, A.; DE SOUZA, A.; ZUNIGA, A.; DAWE, M.; XIONG, Y.; CLIVE, D.; GREINER, R.; NAZYROVA, A.; SHAYKHUTDINOV, R.; LI, L.; VOGEL, H. J.; FORSYTHE, I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic Acids Res** [S.I.], v. 37, n. Database issue, p. D603-10, Jan 2009.

XU, X.; ZHAO, X.; LIU, T. C.; PAN, H. Low-intensity laser irradiation improves the mitochondrial dysfunction of C2C12 induced by electrical stimulation. **Photomed Laser Surg** [S.I.], v. 26, n. 3, p. 197-202, Jun 2008.

YAFFE, D.; SAXEL, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. **Nature** [S.I.], v. 270, n. 5639, p. 725-7, Dec 22-29 1977.

ZHANG, Y.; SONG, S.; FONG, C. C.; TSANG, C. H.; YANG, Z.; YANG, M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. **J Invest Dermatol** [S.I.], v. 120, n. 5, p. 849-57, May 2003.

APÊNDICE I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUUF - BR

cephumanos@power.ufscar.br

<http://www.propq.ufscar.br>

Parecer Nº. 040/2011

Título do projeto: Efeitos do laser de baixa intensidade sobre a modulação da expressão gênica global de homens jovens sob treinamento físico de força

Área de conhecimento: 4.00 - Ciências da Saúde / 4.08 - Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Pesquisador Responsável: CLEBER FERRARESI

Orientador: Nivaldo Antonio Parizotto

Colaborador(es): Vanderlei Salvador Bagnato

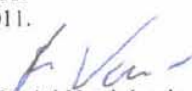
CAAE: 0150.0.135.000-10 **Processo número:** 23112.003955/2010-83 **Grupo:** II

Parecer

As pendências apontadas no Parecer nº. 493/2010 foram satisfatoriamente resolvidas. **Projeto aprovado.** Atende as exigências contidas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
 - O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.2), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
 - O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
 - Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
 - Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente dentro de 1 (um) ano a partir desta data e ao término do estudo.
- São Carlos, 11 de janeiro de 2011.


Prof. Dr. Daniel Vendruscolo
Coordenador do CEP/UFSCar

APÊNDICE II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUF - BR

cephumanos@power.ufscar.br

<http://www.propq.ufscar.br>

Parecer N°. 205/2012

Título do projeto: EFEITOS DA FOTOTERAPIA POR LED DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE INDICADORES CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS, BIOMECÂNICOS, HISTOLÓGICOS E GENÉTICOS DO DESEMPENHO MUSCULAR DE HUMANOS SUBMETIDOS A TREINAMENTO FÍSICO DE FORÇA.

Pesquisador Responsável: CLEBER FERRARESI

Orientador: NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO

Colaborador(es): Vanderlei Salvador Bagnato

CAAE: 0326.0.135.000-11

Processo número: 23112.004205/2011-02

Grupo: II

Área de conhecimento: 4.00 - Ciências da Saúde / 4.08 - Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Análise da Folha de Rosto

Parecer: O projeto foi levado à categoria de pendência, incluindo-se o necessário para ser considerado aprovado. Os pesquisadores atenderam as exigências. Portanto, projeto aprovado.

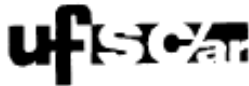
Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente dentro de 1 (um) ano a partir desta dada e ao término do estudo.

São Carlos, 3 de maio de 2012.


Prof. Dr. Daniel Vendruscolo
Coordenador do CEP/UFSCar

APÊNDICE III



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUF - BR

Parecer Nº. 217/2012

Título do projeto: EFEITOS DA FOTOTERAPIA POR LED DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE INDICADORES CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E BIOMECÂNICOS DO DESEMPENHO MUSCULAR EM ATLETAS.

Pesquisador Responsável: CLEBER FERRARESI

Orientador: Vanderlei Salvador Bagnato

Colaborador(es): NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO

CAAE: 0327.0.135.000-11

Processo número: 23112.004206/2011-09

Grupo: II

Área de conhecimento: 4.00 - Ciências da Saúde / 4.08 - Fisioterapia e Terapia Ocupacional

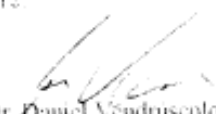
Conclusão

As pendências apontadas no Parecer nº. 170/2012 foram satisfatoriamente resolvidas. **Projeto aprovado.** Atende as exigências contidas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – item IV.1.1) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – na íntegra, por ele assinado (item IV.2.d).
- O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.2), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requer ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também a mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente dentro de 1 (um) ano a partir desta data e ao término do estudo.

São Carlos, 8 de maio de 2012.


Prof. Dr. Daniel Vendruscolo
Coordenador do CEP/UFSCar

ANEXO I

Review

Cleber Ferraresi, Michael R. Hamblin* and Nivaldo A. Parizotto

Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light

Low-Level-Laser (Licht)-Therapie an Muskelgewebe – Möglichkeiten zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit und zur Behandlung von Muskelermüdung und Muskelverletzungen

Abstract: The use of low level laser (light) therapy (LLLT) has recently expanded to cover areas of medicine that were not previously thought of as the usual applications such as wound healing and inflammatory orthopedic conditions. One of these novel application areas is LLLT for muscle fatigue and muscle injury. Since it is becoming agreed that mitochondria are the principal photoacceptors present inside cells, and it is known that muscle cells are exceptionally rich in mitochondria, this suggests that LLLT should be highly beneficial in muscle injuries. The ability of LLLT to stimulate stem cells and progenitor cells means that muscle satellite cells may respond well to LLLT and help muscle repair. Furthermore the ability of LLLT to reduce inflammation and lessen oxidative stress is also beneficial in cases of muscle fatigue and injury. This review covers the literature relating to LLLT and muscles in both preclinical animal experiments and human clinical studies. Athletes, people with injured muscles, and patients with Duchenne muscular dystrophy may all benefit.

Keywords: low level laser therapy; muscle fatigue; muscle injury; mitochondria; ATP; reactive oxygen species; satellite cells.

Zusammenfassung: Die Anwendung der Low-Level-Laser (Licht)-Therapie (LLLT) hat sich in letzter Zeit um Bereiche der Medizin erweitert die über die üblichen Anwendungen wie Wundheilung und Behandlung von entzündlichen orthopädischen Leiden hinausgehen. Einen solchen neuen Bereich stellt der Einsatz der LLLT bei Muskelermüdung und Muskelverletzung dar. Seit es Konsens ist, dass die Mitochondrien die wichtigsten Photoakzeptoren innerhalb einer Zelle darstellen, und es bekannt ist, dass Muskelzellen besonders reich an Mitochondrien sind, hat

sich die Idee entwickelt, dass die LLLT auch bei Muskelverletzungen nutzbringend eingesetzt werden könnte. Da es möglich ist, Stammzellen und Vorläuferzellen mittels LLLT zu stimulieren, liegt die Vermutung nahe, dass Muskel-Satellitenzellen auf die LLLT gut ansprechen und diese Therapie genutzt werden könnte, um Muskeln zu reparieren. Darüber hinaus ist die Fähigkeit der LLLT, Entzündungen zu reduzieren und oxidativen Stress zu verringern auch in Fällen von Muskelermüdung und -verletzungen vorteilhaft. Der vorliegende Review-Artikel gibt einen Überblick über die aktuelle Literatur zum Thema LLLT und Muskeln und umfasst sowohl vorklinische Tierversuche als auch klinische Studien am Menschen. Von den Forschungsergebnissen können Sportler, Menschen mit Muskelverletzungen und Patienten, die an einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne erkrankt sind, gleichermaßen profitieren.

Schlüsselwörter: Low-Level-Laser-Therapie; Muskelermüdung; Muskelverletzung; Mitochondrien; ATP; reaktive Sauerstoffspezies; Satellitenzellen.

***Corresponding author: Michael R. Hamblin**, BAR414, Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital, 40 Blossom Street, Boston, MA 02114, USA, e-mail: mhamblin@partners.org

Michael R. Hamblin: Harvard-MIT Division of Health Science and Technology, Cambridge, MA 02139, USA; and Department of Dermatology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

Cleber Ferraresi: Laboratory of Electro-thermo-phototherapy, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo 13565-905, Brazil; and Department of Biotechnology, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo 13565-905, Brazil

Nivaldo A. Parizotto: Laboratory of Electro-thermo-phototherapy, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos,

Low-Level Laser Therapy and Light-Emitting Diode Therapy on Muscle Tissue: Performance, Fatigue, and Repair

53.1	Introduction to Muscle Fatigue.....	611
53.2	LLLT and Light-Emitting Diode Therapy for Improvement of Muscle Performance	612
	Experimental Models • Clinical Trials: Acute Responses • Clinical Trials: Chronic Responses	
53.3	LEDT and Exercise.....	614
	Clinical Trials: Acute Responses	
53.4	Mechanisms of Action of LLLT and LEDT for Performance, Repair, and to Prevent Muscle Fatigue.....	618
	Energetic Metabolism • Enzyme Modulation	
53.5	ROS and RNS	620
53.6	Repair of Muscle Damage.....	623
53.7	Gene Expression Effects.....	624
53.8	Possible Mechanisms of Action.....	624
	Changes in Relationship between ADP, Pi, Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , and pH • Excitability of Muscle Fiber and Electromyography	
53.9	New Perspectives	625
	Duchenne Muscular Dystrophy	
	References.....	627

Cleber Ferraresi
Federal University of São Carlos

Nivaldo A. Parizotto
Federal University of São Carlos

53.1 Introduction to Muscle Fatigue

The intense use of muscles during high-intensity exercise or during repeated muscle contractions leads to a decrease in muscle performance and appearance of peripheral muscle fatigue (Allen, Lamb, and Westerblad 2008; Westerblad, Bruton, and Katz 2010). Muscle fatigue is a complex phenomenon with many theories and scientific evidence to explain its process of appearance. Among the scientific evidence, we highlight the depletion of energy sources such as phosphocreatine, glycogen, increased amounts of phosphate inorganic (Pi), adenosine diphosphate (ADP), Ca²⁺, Mg²⁺, H⁺, and lactate, and decreased sensitivity of myofibrils to Ca²⁺ and higher production or accumulation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) during exercises (Allen, Lamb, and Westerblad 2008; Westerblad and Allen 2011; Westerblad, Bruton, and Katz 2010).

Peripheral muscle fatigue can affect one or more of the following events during muscle contraction (Allen, Lamb, and Westerblad 2008; Westerblad, Bruton, and Katz 2010): (1) action potential generation at the neuromuscular junction, (2) propagation of action potential along the sarcolemma and also through the T-tubule system, (3) activation of voltage-dependent sensors at the walls of T-tubules for opening Ca²⁺ channels in the sarcoplasmic reticulum, (4) Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum into the sarcoplasm, (5) binding of Ca²⁺ to troponin C (TnC) and movement of tropomyosin that exposes the binding site of actin with myosin, (6) formation of cross-bridges and beginning of muscle contraction, (7) constant pumping of Ca²⁺ into the sarcoplasmic reticulum and decreased concentration of Ca²⁺ in the sarcoplasm, and (8) muscle relaxation.

The energy sources for adenosine triphosphate (ATP) synthesis used during muscle contraction may be predominantly

ANEXO II



Cleber Ferraresi <cleber[REDACTED]@gmail.com>

Fwd: Photochemistry and Photobiology - Decision on Manuscript ID PHP-2014-09-RA-0209.R2

Michael R Hamblin PhD [REDACTED]

25 de novembro de 2014 15:54

Para: Cleber Ferraresi [REDACTED]

if you want to have a go at graphical abstract?

Begin forwarded message:

From: [REDACTED]
Subject: Photochemistry and Photobiology - Decision on Manuscript ID PHP-2014-09-RA-0209.R2
Date: November 25, 2014 at 12:42:00 PM EST
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]

25-Nov-2014

Mike:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 hours" in its current form for publication in Photochemistry and Photobiology.

Please note that a few references are not complete and suitable abbreviations are required for several Journals.

The "AcceptedArticle" publication procedure used by Photochemistry and Photobiology implies that accepted papers will be posted online within a few days after acceptance, in the form of an uncorrected PDF-proof. The paper is immediately given a Digital Object Identifier (DOI), which allows it to be cited and tracked. Once the manuscript is proofread and corrected, the EarlyView article will be posted online and the Accepted Article version removed

Please note that your galley proofs will be sent via email within approximately 4 weeks of this letter. Please add the following address to your "accept" or "white list" to avoid the proofs being marked as spam. The address is: spseproof@sps.co.in

The galley proof serves as your opportunity to review and make corrections to your article during the production process. You will work with the proofreader, who will incorporate any alterations you may have along with any minor changes (spelling, grammar). Corrections after the articles appear online can only be made in the form of a "correction line" added to the text, or a separately published erratum at the discretion of the editor.

Regarding the copyright; the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting you to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) you will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

If you have not already uploaded the graphical abstract files, please send them by mail to the managing editor (asp.ed@cea.fr).

Please feel free to contact us if you have any questions.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Photochemistry and Photobiology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Jean Cadet

332

ANEXO III

Lasers in Medical Science

Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice
Article Type:	Original Article
Keywords:	Light emitting diode therapy, muscle ATP content, photobiomodulation, resistance to exercise fatigue, time response
Corresponding Author:	Cleber Ferraresi, PhD Federal University of Sao Carlos Sao Carlos, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Sao Carlos
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Cleber Ferraresi, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Cleber Ferraresi, PhD Marcelo Victor Pires de Sousa, PhD Ying-Ying Huang, PhD Vanderlei Salvador Bagnato, PhD Nivaldo Antonio Parizotto, PhD Michael R Hamblin, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Recently low-level laser (light) therapy has been used to increase muscle performance in intense exercises. However, there is a lack of understanding of the time response of muscles to light therapy. The first purpose of this study was to determine the time response for light-emitting diode therapy (LEDT) mediated increase in adenosine triphosphate (ATP) in the soleus and gastrocnemius muscles in mice. Second purpose was to test whether LEDT can increase the resistance of muscles to fatigue during intense exercise. Fifty male Balb/c mice were randomly allocated into 2 equal groups: LEDT-ATP and LEDT-Fatigue. Both groups were subdivided into 5 equal subgroups: LEDT-Sham; LEDT-5min; LEDT-3 h; LEDT-6h and LEDT-24h. Each subgroup was analyzed for muscle ATP content or fatigue at specified time after LEDT. The fatigue test was performed by mice repeatedly climbing an inclined ladder bearing a load of 150% of body weight until exhaustion. LEDT used a cluster of LEDs with 20 red (630 ± 10 nm, 25 mW) and 20 infrared (850 ± 20 nm, 50 mW) delivering 80 mW/cm² for 90 sec (7.2 J/cm²) applied to legs, gluteus and lower-back muscles. LEDT-6h was the subgroup with the highest ATP content in soleus and gastrocnemius compared to all subgroups (P < 0.001). In addition, mice in LEDT-6h group performed more repetitions in the fatigue test (P < 0.001) compared to all subgroups: LEDT-Sham and LEDT-5min (~ 600%); LEDT-3h (~ 200%) and LEDT-24h (~ 300%). A high correlation between the fatigue test repetitions and the ATP content in soleus (r = 0.84) and gastrocnemius (r = 0.94) muscles was observed. LEDT increased ATP content in muscles and fatigue resistance in mice with a peak at 6 hours. Although the time response in mice and humans is not the same, athletes might consider applying LEDT at 6 hours before competition.</p>

ANEXO IV

FULL ARTICLE

Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation

Cleber Ferraresi^{1, 2, 3, 4}, Nivaldo Antonio Parizotto^{1, 2}, Marcelo Victor Pires de Sousa^{4, 5}, Beatriz Kaippert^{4, 6}, Ying-Ying Huang^{4, 7}, Tomoharu Koiso^{4, 8}, Vanderlei Salvador Bagnato³, and Michael R. Hamblin^{*, 4, 7, 9}

¹ Laboratory of Electrothermophototherapy, Department of Physical Therapy, Federal University of Sao Carlos, SP, Brazil

² Post-Graduation Program in Biotechnology, Federal University of Sao Carlos, SP, Brazil

³ Optics Group, Physics Institute of Sao Carlos, University of São Paulo, Sao Carlos, SP, Brazil

⁴ Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital, 40 Blossom Street, Boston, MA 02114, USA

⁵ Laboratory of Radiation Dosimetry and Medical Physics, Institute of Physics, Sao Paulo University, SP, Brazil

⁶ Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁷ Department of Dermatology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

⁸ Graduate School Biomedical Engineering, Tohoku University, Japan

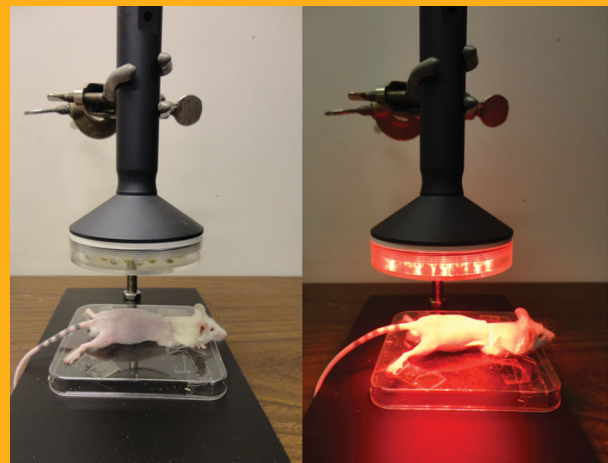
⁹ Harvard-MIT Division of Health Science and Technology, Cambridge, MA, USA

Received 6 August 2014, revised 3 October 2014, accepted 4 October 2014

Published online 7 November 2014

Key words: LLLT, LEDT, muscle performance, muscle recovery, ATP

Light-emitting diode therapy (LEDT) applied over the leg, gluteus and lower-back muscles of mice using a LED cluster (630 nm and 850 nm, 80 mW/cm², 7.2 J/cm²) increased muscle performance (repetitive climbing of a ladder carrying a water-filled tube attached to the tail), ATP and mitochondrial metabolism; oxidative stress and proliferative myocyte markers in mice subjected to acute and progressive strength training. Six bi-daily training sessions LEDT-After and LEDT-Before-After regimens more than doubled muscle performance and increased ATP more than tenfold. The effectiveness of LEDT on improving muscle performance and recovery suggest applicability for high performance sports and in training programs.



Positioning of the mice and light-emitting diode therapy (LEDT) applied on mouse legs, gluteus and lower-back muscles without contact.

* Corresponding author: e-mail: mhamblin@partners.org

ANEXO V



Low-level laser (light) therapy in strength training: a double-blind placebo-controlled clinical trial in a pair of identical twins

Journal:	<i>Lasers in Surgery & Medicine</i>
Manuscript ID:	LSM-14-0244
Wiley - Manuscript type:	Clinical Reports
Date Submitted by the Author:	08-Oct-2014
Complete List of Authors:	Ferraresi, Cleber; São Carlos Federal University , Department of Physical Therapy and Biotechnology Bertucci, Danilo; Federal University of Sao Carlos, Schiavinato, Josiane; Federal University of Sao Carlos, Reiff, Rodrigo; University of São Paulo, Department of Orthopedics and Traumatology Araújo, Amélia; University of São Paulo, Panepucci, Rodrigo; University of São Paulo, Júnior, Euclides; São Carlos Federal University, Department of Biotechnology Cunha, Anderson; Federal University of Sao Carlos, Baldissera, Vilmar; São Carlos Federal University, Department of Physiological Sciences Hamblin, Michael; Massachusetts General Hospital, Wellman Center for Photomedicine Bagnato, Vanderlei; Institute of Physics of São Carlos University of São Paulo, Department of Physics and Science of Materials Parizotto, Nivaldo; Federal University of São Carlos,
Key Words:	low level laser (light) therapy, photobiomodulation, light emitting diode therapy, muscle physiology, strength training, double blind placebo-controlled clinical trial, identical twins

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO VI

Lasers in Medical Science

Light-emitting diode therapy (LEDT) before matches prevents increase in creatine kinase with a light dose response in volleyball players: randomized and double blind placebo-controlled trial --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	LIMS-D-14-00401
Full Title:	Light-emitting diode therapy (LEDT) before matches prevents increase in creatine kinase with a light dose response in volleyball players: randomized and double blind placebo-controlled trial
Article Type:	Original Article
Keywords:	light emitting diode therapy, photobiomodulation, LLLT, CK, muscle damage, exercise recovery, muscle performance
Corresponding Author:	Cleber Ferraresi, PhD Federal University of Sao Carlos Sao Carlos, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Sao Carlos
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Cleber Ferraresi, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Cleber Ferraresi, PhD Ricardo Vinicius dos Santos, PT Guilherme Marques, PT Marcelo Zangrande, BS Roberley Leonardo, BS Michael R Hamblin, PhD Vanderlei Salvador Bagnato, PhD Nivaldo Antonio Parizotto, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Low-level laser (light) therapy (LLLT) has been applied over skeletal muscles before intense exercise (muscular pre-conditioning) in order to reduce fatigue and muscle damage (measured by creatine kinase - CK) in clinical trials. However, previous exercise protocols do not exactly simulate the real muscle demand required in sports. For this reason, the aim of this study was to investigate whether light-emitting diode therapy (LEDT) applied over the quadriceps femoris muscles, hamstrings and triceps surae of volleyball players before official matches could prevent muscle damage (CK). A professional male volleyball team (12 athletes) was enrolled in this study and LEDT was applied before 4 matches during a national championship. LEDT used an array of 200 LEDs arranged in 25 clusters of 4 infrared LEDs (850 ± 20 nm; 130 mW) and 25 clusters of 4 red LEDs (630 ± 10 nm; 80 mW). Athletes were randomized to receive one of 4 different total doses over each muscle group in a double-blind protocol: 65 J (20 s); 130 J (40 s); 195 J (60 s) and Placebo (no light for 30 s). CK in blood was assessed 1h before and 24h after each match. LEDT at 130 J avoided significant increases in CK (+10%; P = 0.993) as well as 195 J (+31%, P = 0.407). Placebo (0 J) allowed a significant increase in CK (+53%; P = 0.012) as well as LEDT at 65 J (+59%; P = 0.001). LEDT prevented significant increases in blood CK in athletes during official matches with a light dose response, suggesting athletes might consider applying LEDT</p>

ANEXO VII



Cleber Ferraresi <cleber[REDACTED]@gmail.com>

Physiotherapy Theory and Practice - Decision on Manuscript ID UPTP-2014-0111.R2

Para: cleber[REDACTED]@gmail.com

27 de outubro de 2014 16:04

27-Oct-2014

Cleber:

The review of your three-time revised manuscript is now completed. It is clear that you considered the recommendations from Dr. Sekerak, and that these were all addressed.

Congratulations, my decision is now to accept your paper. The next step is that you will get proofs from the publisher for you to review. It is likely that your paper will be published in the October issue – 2015. However we are now publishing manuscripts electronically ahead of hard print using e-pub in Med-Line/Pub-Med. This usually occurs about 3 to 6 months prior to hard copy publication, so we may see your article on Med-Line/Pub/Med by later 2014. I am attaching the Copyright form. Please fill this out, sign (only need your signature), and forward to me as a PDF file via e-mail as soon as possible.

I want to thank you for your addition to the journal. If you have questions please do not hesitate to contact me.

Sincerely yours,

Scott M. Hasson, EdD, PT, FACSM, FAPTA – Editor PTP

**PTP-INFORMA-HEALTHCARE-COPYRIGHT.rtf**
137K