

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

VITOR ALEXANDRE PEZOLATO

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO, DO EXERCÍCIO E DA
LESÃO MUSCULAR NUM MODELO EXPERIMENTAL DE
RECUPERAÇÃO ALIMENTAR PÓS DESNUTRIÇÃO EM
RATOS

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Silva

SÃO CARLOS-SP

2019

VITOR ALEXANDRE PEZOLATO

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO, DO EXERCÍCIO E DA
LESÃO MUSCULAR NUM MODELO EXPERIMENTAL DE
RECUPERAÇÃO ALIMENTAR PÓS DESNUTRIÇÃO EM
RATOS

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Fisioterapia da Universidade
Federal de São Carlos, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor
em Fisioterapia.**

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Silva

SÃO CARLOS-SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Vitor Alexandre Pezolato, realizada em 22/07/2019:

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
UFSCar

Prof. Dr. Cleber Ferraresi
USC

Profa. Dra. Carla Roberta Tim
UB

Profa. Dra. Mariana Arias Avila Vera
UFSCar

Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte
UFSCar

Pezolato, Vitor Alexandre

Efeitos da fotobiomodulação, do exercício e da lesão muscular num modelo experimental de recuperação alimentar pós desnutrição em ratos / Vitor Alexandre Pezolato. -- 2019.
183 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Nivaldo Antonio Parizotto

Banca examinadora: Cleber Ferraresi, Carla Roberta Tim, Mariana Arias Avila Vera, Ana Claudia de Oliveira Duarte
Bibliografia

1. Fotobiomodulação. 2. Desnutrição Proteica. 3. Lesão Muscular. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, Rui Roberto Pezolato e Maria Eunice Carpin Pezolato, por todo o incentivo e por caminharem sempre junto a mim, para minha irmã, Gabriela Carpin Pezolato, por ser minha parceira em todos os momentos e para minha companheira de vida, Julia de Moraes Azanha, pela paciência, compreensão e por me ensinar a felicidade.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço imensamente o Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto por ser meu guia, não só nos momentos acadêmicos, ou para falar sobre ciência, mas para vida. Seu profundo conhecimento, cheio de sutileza e sabedoria humana gera um conselho, o qual é capaz de inspirar as pessoas a fazerem o impossível. Obrigado por ter me aceito, ter me acompanhado e despertado a eterna curiosidade.

Agradeço ainda, ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, meu eterno mestre, cujo cobra e faz com que eu tenha um pensamento crítico e “fora da caixinha”, ainda, me eleva, me coloca para cima, me motiva, faz com que todo passo seja para frente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar e dar forças em todos os momentos desta jornada.

Agradeço aos meus pais, eternos acolhedores, principalmente, nas horas mais sombrias que a mente humana pode passar, fazendo sair lastros de luz, os quais serão capazes de iluminar meu dia. Os que fazem o milagre de tudo parecer fantástico.

A minha mulher, Júlia, a qual mudou minha vida, fez eu acreditar em mim, seguir em frente, enfrentar o mundo e mostrar que ele não é grande assim. Ela é capaz de mostrar todos os dias que o sonho pode virar realidade.

Minha irmã, a qual me enaltece em tudo que faço, que caminharia comigo até o precipício, a qual eu devo agradecer todos os dias por me fazer rir.

Ao meu amigo Rodrigo Dias, que foi capaz de estar presente todos os dias do meu doutorado, no laboratório, após horas de experimentação e ainda sim gargalharmos depois de completar 1500 análises de glicogênio.

Para minha amiga Ana Laura, que em momentos que os prazos ficam curtos, as pesquisas extensas, sua ajuda faz com que tudo fique calmo.

Meus amigos, eternos amigos, aqueles raros e único, só estou aqui graças a vocês.

A todos meus parceiros de doutorado, que das mais diversas formas me auxiliaram nestes anos.

A Capes e ao CNPq por todo o apoio financeiro.

Muito Obrigado!

*Ticking away the moments that make up a dull day
You fritter and waste the hours in an offhand way
Kicking around on a piece of ground in your home town
Waiting for someone or something to show you the way*

*Tired of lying in the sunshine
Staying home to watch the rain
You are young and life is long
And there is time to kill today
And then one day you find
Ten years have got behind you
No one told you when to run
You missed the starting gun*

*And you run and you run to catch up with the sun, but it's sinking
And racing around to come up behind you again
The sun is the same in a relative way, but you're older
Shorter of breath and one day closer to death*

*Every year is getting shorter
Never seem to find the time
Plans that either come to naught
Or half a page of scribbled lines
Hanging on in quiet desperation is the english way
The time has gone, the song is over
Thought I'd something more to say*

*Home, home again
I like to be here when I can
And when I come home cold and tired
It's good to warm my bones beside the fire
Far away, across the field
The tolling of the iron bell
Calls the faithful to their knees
To hear the softly spoken magic spells
(Pink Floyd)*

RESUMO

A desnutrição proteica acarreta efeitos negativos de curto e longo prazo no funcionamento dos mais variados tecidos. Desta maneira, o presente estudo teve como foco avaliar as modulações frente aos parâmetros bioquímicos, teciduais, nutricionais, capacidade adaptativa e manutenção de cargas de treinamento aeróbico, resposta metabólica frente ao exercício físico, resistência a tração muscular, sendo essas características associadas ou não com a fotobiomodulação, tanto em animais que passaram pelo processo de desnutrição proteica e recuperação nutricional, como em animais que se alimentaram de dieta normoproteica. Para tanto, ratos da linhagem *Wistar*, desmamados no 21º dia de vida, foram randomicamente divididos em 8 grupos, e assim denominados: controle (C), controle treinado (CT), controle treinado e lesionado (CTL), controle treinado e irradiado (CTLa), controle treinado lesionado e irradiado (CTLLa), desnutrido recuperado (DR), desnutrido recuperado treinado (DRT), desnutrido recuperado e lesionado (DRTL), desnutrido recuperado treinado e irradiado (DRTLla), desnutrido treinado lesionado e irradiado (DRTLLa). A análise estatística foi precedida pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, em seguida houve comparações inter e intra-grupos, para isso foi aplicado teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) de comparações múltiplas, seguido pelo teste de *Sidak* para dados paramétricos, sendo considerado o valor crítico de $p < 0,05$ para significância estatística. A condição de desnutrição proteica, quando delineado nos estágios iniciais e críticos de desenvolvimento pode acarretar em alterações nos marcadores biológicos, os quais podem ser recuperados com a dieta normoproteica, porém como a deformação do tecido muscular, a condução elétrica cardíaca e parâmetros sanguíneos podem não ser recuperados. Ainda, os efeitos terapêuticos da fotobiomodulação favorece a condição energética frente ao exercício físico, como

melhora a resistência de tração muscular e aumentar as reservas de glicogênio, podendo ser um bom instrumento a ser utilizado para melhora da performance, quanto para prevenção e recuperação de lesões.

Palavras-chave: desnutrição proteica, fotobiomodulação, exercício, recuperação nutricional, lesão muscular, ratos.

ABSTRACT

Protein malnutrition has negative short- and long-term effects on the functioning of the most varied tissues. In this way, the present study focused on the evaluation of the biochemical, tissue and nutritional parameters, adaptive capacity and maintenance of aerobic training loads, metabolic response to physical exercise, muscular tensile strength, being these characteristics associated or not with the laser therapy, both in animals that underwent the process of protein malnutrition and nutritional recovery, as in animals that were fed a normoprotein diet. For this purpose, *Wistar* rats, weaned on the 21st day of life, were randomly divided into 10 groups, so-called: control (C), trained control (CT), trained and injured control (CTL), trained and irradiated control (CTLa), trained and irradiated trained control (CTLLa), recovered malnourished (DR) trained recovered malnourished (DRT), recovered and injured malnourished (DRTL), trained and irradiated recovered malnourished (DRTLla), trained injured and irradiated recovered malnourished (DRTLla). Statistical analysis was performed by the *Shapiro-Wilk* normality test, followed by intra and intra-group comparisons, for which two-way ANOVA was used for multiple comparisons, followed by the *Sidak* test for parametric data, for non-parametric data the *Kruskal-Wallis* test was performed followed by the *Dunn* test, considering the critical value of $p < 0.05$ for statistical significance. The condition of protein malnutrition when delineated in the early and critical stages of development may lead to changes in biological markers, which can be recovered with the normoprotein diet, but as deformation of muscle tissue, cardiac electrical conduction and blood parameters may not be recovered. Still, the photobiomodulation seems to favor the energetic condition in the physical exercise, such as improving muscular

tensile strength and increasing glycogen reserves and may be a good instrument to be used for performance improvement, as well as for injury prevention and recovery.

Keyword: protein malnutrition, laser therapy, exercise, nutritional recovery, muscle injury, rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMPc – mono-fosfato de adenosina cíclico

AMPK – proteína quinase ativada por AMP

ANILAB – Laboratório de diagnóstico animal

ANOVA - Análise de Variância

AsALGa -Arseneto Gálio Alumínio

ATP – Trifosfato de adenosina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CK – Creatina quinase

cm - Centímetro

cm² - Centímetro Quadrado

ECG – Eletrocardiograma

FC – Frequência cardíaca

g - Gramas

g/cm² - Grama por centímetro quadrado

GH – Hormônio do crescimento

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

J - Joule

J/cm² - Joule por centímetro quadrado

KOH – hidróxido de potássio

LDH – lactato desidrogenase

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LLLT - Terapia Laser de Baixa Intensidade

LSH – Lipase hormônio sensível

m.min⁻¹ – Metros percorridos em um minuto

MFEL – Máxima fase estável de lactato

mTOR – *mammalian target of rapamycin*

mW - MilliWatts

MyoD – Proteína de diferenciação miogênica

nm - nanômetro

n^o - número

s - Segundos

TA – Tibial anterior

TS – Tríceps sural

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

UNIMEP – Universidade Metodista de Piracicaba

μl – microlitro

< Menor que

> Maior que

% - Porcentagem

\pm - Mais ou Menos

LISTA DE FIGURAS

1. Estudo I

Figura 1. Desenho experimental, seguindo uma linha temporal com as análises que foram realizadas em cada momento.

Figura 2. Variação da massa corporal em relação ao tempo, assim como o valor de p ajustado ($p < 0,05$).

Figura 3. Máxima fase estável de lactato (MLSS), sendo A no 90º dia de experimento, averiguando diferentes velocidade ($20\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $22\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $24\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) tanto nos grupos com dieta normoproteica, quanto nos grupos com dieta hipoproteica. B, demonstra o 126º dia de experimento, averiguando diferenças entre os grupos treinados e treinados irradiados com a mesma velocidade ($24\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$), tanto nos grupos com dieta normoproteica, quanto nos grupos com dieta hipoproteica. * diferença estatística entre os grupos, sendo $p < 0,05$.

Figura 4. Primeiramente, A demonstra o nível de hematócrito sanguíneo (%), nos momentos 45 dias, 90 dias e 135 dias, sendo * diferença estatística entre os grupos, $p < 0,05$. B demonstra o nível do lactato sanguíneo (mmMol/ml) ao final do teste de exaustão, nos diferentes grupos, sendo * $p < 0,05$ em relação ao grupo C90, α $p < 0,05$ em relação ao grupo DR90, β $p < 0,05$ em relação ao grupo C, χ $p < 0,05$ em relação ao grupo DR. O teste de exaustão(min) é visto em C, sendo * $p < 0,05$ entre os grupos, α $p < 0,05$ em relação aos demais grupos menos DR, β $p < 0,05$ em relação aos demais grupos menos C.

2. Estudo II

Figura 1. Desenho experimental, seguindo uma linha temporal com as análises que foram realizadas em cada momento.

Figura 2. A: Tricotomização da região, a qual foi realizada a criolesão. B: Processo de exposição do ventre muscular do tibial anterior. C: Colocação da haste, a qual passou pelo nitrogênio líquido, sobre o ventre muscular. D: Final do processo da criolesão.

Figura 3. A: Nível sérico de globulina. B: Nível sérico de albumina. C: Proteínas totais no sangue. D: Nível sérico de creatinina. * diferença estatística em relação ao grupo C, sendo $p < 0,05$; α diferença estatística em relação ao grupo DR, sendo $p < 0,05$; β diferença estatística em relação ao grupo CT, sendo $p < 0,05$; χ diferença estatística

em relação ao grupo DRT, sendo $p < 0,05$; δ diferença estatística em relação ao grupo CTL, sendo $p < 0,05$; ε diferença estatística em relação ao grupo DRTL, sendo $p < 0,05$; ϕ diferença estatística em relação ao grupo CTLLa, sendo $p < 0,05$; γ diferença estatística em relação ao grupo DRTLLa, sendo $p < 0,05$; η diferença estatística em relação ao grupo C45, sendo $p < 0,05$; φ diferença estatística em relação ao grupo DR45, sendo $p < 0,05$; ι diferença estatística em relação ao grupo C90, sendo $p < 0,05$.

Figura 4. A: Teste de tração do músculo tibial anterior (AT). B: Teste de tração do músculo tríceps sural (TS). C: Deformação até a ruptura do músculo AT. D: Deformação até a ruptura do músculo TS. * diferença estatística em relação ao grupo C, sendo $p < 0,05$; α diferença estatística em relação ao grupo DR, sendo $p < 0,05$; β diferença estatística em relação ao grupo CT, sendo $p < 0,05$; χ diferença estatística em relação ao grupo DRT, sendo $p < 0,05$; δ diferença estatística em relação ao grupo CTL, sendo $p < 0,05$; ε diferença estatística em relação ao grupo DRTL, sendo $p < 0,05$; ϕ diferença estatística em relação ao grupo CTLLa, sendo $p < 0,05$; γ diferença estatística em relação ao grupo DRTLLa, sendo $p < 0,05$; η diferença estatística em relação ao grupo C45, sendo $p < 0,05$; φ diferença estatística em relação ao grupo DR45, sendo $p < 0,05$; ι diferença estatística em relação ao grupo C90, sendo $p < 0,05$.

Figura 5. A: Glicogênio muscular. B: Teste de exaustão. * diferença estatística em relação ao grupo C, sendo $p < 0,05$; α diferença estatística em relação ao grupo DR, sendo $p < 0,05$; β diferença estatística em relação ao grupo CT, sendo $p < 0,05$; χ diferença estatística em relação ao grupo DRT, sendo $p < 0,05$; δ diferença estatística em relação ao grupo CTL, sendo $p < 0,05$; ε diferença estatística em relação ao grupo DRTL, sendo $p < 0,05$.

3. Estudo III

Figura 1. Desenho experimental, seguindo uma linha temporal com as análises que foram realizadas em cada momento.

Figura 2. A: Índice de massa corporal (IMC), B: Índice de peso do coração, C: Índice de peso do pulmão. Para todos os gráficos foi atribuído * para $p < 0,05$ em relação ao grupo C45, α para $p < 0,05$ em relação ao grupo C90, β para $p < 0,05$ em relação ao grupo C, δ para $p < 0,05$ em relação ao grupo CT.

Figura 3. A: frequência cardíaca. B: Colesterol Total. C: Triglicerídeos. Para todos os gráficos foi atribuído * para $p < 0,05$ em relação ao grupo C45, α para $p < 0,05$ em

relação ao grupo C90, β para $p < 0,05$ em relação ao grupo C, χ para $p < 0,05$ em relação ao grupo DR, δ para $p < 0,05$ em relação ao grupo CT, ϵ para $p < 0,05$ em relação ao grupo DRT, ϕ para $p < 0,05$ em relação ao grupo CTLa.

Figura 4. Demonstração das ondas isoladas do ECG, nos diferentes grupos, sendo apontadas os picos de cada onda.

Figura 5. A: Onda P do ECG. B: Complexo QRS. C: Pico de onda R. D: Intervalo PR. E: Segmento PR. F: Intervalo QT corrigido. Para todos os gráficos foi atribuído β para $p < 0,05$ em relação ao grupo C, ϵ para $p < 0,05$ em relação ao grupo DRT, ϕ para $p < 0,05$ em relação ao grupo CTLa.

Figura 6. Alterações da condução cardíaca encontrada nos grupos DR45, DR90 e DR, nas derivações DII, DI e AVL.

LISTA DE TABELAS

1. Estudo I

Tabela 1. Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição recuperação nutricional.

Tabela 2. Protocolo de treinamento, demonstrando a duração do treino em minutos, velocidade em metros por minuto ($m \cdot min^{-1}$) e a carga de treino.

Tabela 3. Parâmetros de aplicação do laser de baixa intensidade GaAIs

Tabela 4. Glicogênio muscular e hepático com os valores representado em mg/100mg.

2. Estudo II

Tabela 1. Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição recuperação nutricional.

Tabela 2. Protocolo de treinamento, demonstrando a duração do treino em minutos, velocidade em metros por minuto ($m \cdot min^{-1}$) e a carga de treino.

Tabela 3. Parâmetros de aplicação do laser de baixa intensidade GaAIs.

Tabela 4. Massa Corporal (g) dos animais nos diferentes períodos do experimento. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C no dia 126 de experimento; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DR no dia 126 de experimento.

3. Estudo III

Tabela 1. Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição recuperação nutricional.

Tabela 2. Protocolo de treinamento, demonstrando a duração do treino em minutos, velocidade em metros por minuto ($m \cdot min^{-1}$) e a carga de treino.

Tabela 3. Parâmetros de aplicação do laser de baixa intensidade GaAIs

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
ABREVIATURAS E SIMBOLOS	13
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS	19
PRIMEIRA PARTE	22
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
HIPÓTESES	31
OBJETIVO GERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
SEGUNDA PARTE	33
2. ESTUDO – I	34
RESUMO	35
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	38
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
3. ESTUDO – II	64
RESUMO	65
INTRODUÇÃO	67
MATERIAL E MÉTODOS	68
RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	84
CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
4. ESTUDO – III	94
RESUMO	96
INTRODUÇÃO	98
MATERIAL E MÉTODOS	99
RESULTADOS	107
DISCUSSÃO	111
CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

TERCEIRA PARTE	120
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	123
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	126
ANEXOS	
ANEXO I – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ESTUDO I	128
ANEXO II - CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ESTUDO II	130
ANEXO III – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	132

PRIMEIRA PARTE

CONTEXTUALIZAÇÃO
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
HIPÓTESES
OBJETIVO GERAL
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A desnutrição é definida como uma condição na qual o organismo apresenta desequilíbrio e/ou deficiência energética dos reconhecidos macro nutrientes como proteínas, carboidrato e/ou lipídeos e/ou micronutrientes (GURMINI et al., 2005; LOCHS et al., 2006). Essa condição é capaz de gerar diferentes magnitudes no que diz respeito a deficiência da estatura e massa corporal, podendo extrapolar para um déficit no desenvolvimento neuropsicomotor (WHO, 2018). Sendo que o exercício físico concomitante a própria ingestão proteica equilibrada, são considerados como componentes primordiais para otimização da função muscular ao longo do processo de envelhecimento (DEUTZ et al., 2014).

Neste contexto, a deficiência ou falta de aquisição ou absorção de nutrientes, principalmente, proteínas, é denominada desnutrição proteica, sendo que a mesma pode estar associada com uma baixa ingestão de carboidratos, sendo que nesse caso se caracterizaria como desnutrição energético-proteica (SIZER, 2003).

Ainda, independentemente do tipo de desnutrição proteica, há o comprometimento da massa e estatura corporal, sendo presente em maior ou menor magnitude, caracterizando a importância dos indicadores antropométricos para o diagnóstico da desnutrição infantil (WHO, 2018).

Os valores antropométricos mais utilizados são a própria massa e estatura corporal tendo como comparativo os dados esperados para a idade relacionada. Desta maneira, a desnutrição proteica tem a seguinte classificação: primeiro grau, quando há deficiência ponderal de 10-24%, segundo grau, quando a deficiência ponderal é de 25-40%; terceiro grau, quando a deficiência ponderal é superior a 40%, podendo apresentar edema de forma independente da massa corporal (GÓMEZ SANTOS, 2016).

A condição crônica de privação nutricional, se enquadrando na desnutrição de terceiro grau, reconhecidamente, apresenta potencial para induzir as diferentes síndromes relacionadas, sendo estas, denominadas marasmo, Kwashiorkor ou Kwashiorkor marásmico (RYTTER et al., 2015).

Caracteristicamente, na desnutrição proteica denominada marasmo, a deficiência alimentar é oriunda de uma insuficiência calórica, gerando uma diminuição grave no tecido músculo esquelético, com perda dos estoques de gordura corporal, principalmente de gordura subcutânea, pele seca e fina, cabelo frágil,

úlceras, dificuldade de cicatrização tecidual, diarreia, sistema imunológico comprometido, sendo esta a condição mais comum (SIZER, 2003; ALVES; DÂMASO; DAL PAI, 2008).

A palavra *Kwashiorkor* é decorrente de um dos dialetos de Gana, tendo como significado “espírito mau que infecta o primeiro filho quando o segundo nasce”, sendo que tal interpretação é justificada pelos altos índices de desnutrição que o país sofre (SIZER, 2003).

Assim, a desnutrição proteica denominada de Kwashiorkor é caracterizada pela deficiência alimentar de proteínas e ingestão normal ou elevada de carboidratos, desta maneira o consumo calórico pode se apresentar adequado, porém irá gerar diminuição da massa e estatura corporal, do tecido músculo esquelético, porém com aumento ou preservação da gordura corporal, podendo gerar esteatose hepática, úlceras de difícil cicatrização, diarreia, notória perda de apetite, sendo de classificação edematosa (SIZER, 2003; ALVES; DÂMASO; DAL PAI, 2008).

Por fim, se caracteriza como desnutrição Kwashiorkor marasmo, a deficiência alimentar provida da insuficiência proteica e de fontes alimentares relacionadas primariamente com o próprio fornecimento de energia, ainda será classificada como edematosa (SIZER, 2003; ALVES; DÂMASO; DAL PAI, 2008).

Ainda, por mais que dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrem que as taxas de mortalidade infantil vêm diminuindo ao longo dos anos, sendo que o principal fator da mortalidade é a desnutrição, a sobrevivência infantil continua a ser preocupação permanente (WHO, 2018).

A OMS considera que a taxa de mortalidade infantil é um indicador-chave do bem-estar das crianças de uma dada população frente as condições nutricionais (WHO, 2018). Assim, 20% da incidência da mortalidade infantil ocorre em crianças com idade inferior a 5 anos, podendo ser decorrente da baixa massa e estatura corporal ao nascer, associada a desnutrição, sendo que esses fatores somados com baixa infraestrutura geral o valor referido (WHO, 2018). Ainda, entre 1990 e 2013, cerca de 223 milhões de crianças morreram antes de completar o primeiro ano de vida (WHO, 2018).

Frente as elevadas taxas de mortalidade infantil decorrente da desnutrição, tem sido enaltecido o uso de animais para realizar pesquisas experimentais, demonstrando as importantes funcionalidades da correta ingestão e digestão das proteínas para a homeostasia celular, sendo que sua restrição pode modular

negativamente o funcionamento e/ou desenvolvimento dos mais variados tecidos (GURMINI et al., 2005; PRADA; MACEDO; MELLO, 2007; VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2007; PEZOLATO et al., 2013a, 2013b, 2015; JERONIMO et al., 2016; LOPES et al., 2017).

Os estudos que se propuseram a induzir uma deficiência na ingestão de proteínas nos estágios iniciais e críticos do desenvolvimento, observaram modificações estruturais no tecido cardíaco, como a diminuição da massa absoluta do miocárdio, do ventrículo direito, menor pressão máxima desenvolvida ao final da sístole, deficiência na absorção de proteínas, diminuição na contagem dos eritrócitos, da manutenção dos hematócritos, menor ligação da insulina aos seus receptores específicos nos próprios eritrócitos, diminuição dos leucócitos totais circulantes, dos linfócitos T associado a manutenção da contagens dos linfócitos B e células *Natural Killers*, diminuição do ácido desoxirribonucleico mitocondrial, do glicogênio diafragmático, ventricular, no gastrocnêmio vermelho e aumento de glicogênio no córtex cerebral (CORTÉS-BARBERENA et al., 2008; ASSOCIAÇÃO SERGIPANA DE CIÊNCIA et al., 2014; PEZOLATO et al., 2017).

Ainda, estudos que se propuseram a avaliar os efeitos da recuperação nutricional após a indução da desnutrição proteica nos estágios iniciais e críticos do desenvolvimento dos animais experimentais, tem demonstrado, recuperação total, parcial, ou mesmo nenhum indício de recuperação no que diz respeito ao funcionamento e/ou desenvolvimento dos mais variados tecidos (RENNÓ et al., 2011; PEZOLATO et al., 2013a, 2015; JERONIMO et al., 2016; PERTILLE et al., 2016; LOPES et al., 2017), realçando a importância das proteínas para a manutenção da homeostasia celular.

Considerando a persistência das elevadas taxas de desnutrição, é necessário o melhor entendimento dos efeitos da privação de proteínas no organismo e as subsequentes desordens fisiológicas associadas.

Essa desnutrição proteica, quando ocorre nos primeiros estágios do desenvolvimento, acarreta em baixa estatura e altura corporal, os quais são importantes indicadores antropométricos em associação aos indicadores bioquímicos para o diagnóstico do referido quadro, assim, a classificação da desnutrição grau I é quando há uma diferença ponderal de 10-24%, de grau II, 25-40%, sendo que acima disto se enquadraria em grau III (GUERI; GURNEY; JUTSUM, 1980). Vale ressaltar que as síndromes denominadas marasmo, Kwashiorkor ou Kwashiorkor marásmico

são interpretadas como manifestações extremas da desnutrição proteica de terceiro grau (RYTTER et al., 2015).

Caracteristicamente, a desnutrição proteica denominada marasmo é a deficiência alimentar provinda, primariamente, de uma insuficiente ingestão calórica total, associada a ingestão nutricional desequilibrada, sendo relacionada, diretamente com o fornecimento de energia, no caso, carboidratos (SIZER, 2003). Essa síndrome é caracterizada por deficiência severa da massa e estatura corporal, com diminuição grave do tecido músculo esquelético e perdas dos estoques de gordura corporal, pele fina e seca, redundantes sobras cutâneas, cabelo facilmente arrancado, úlceras frequentes de difícil cicatrização, diarreia, notória diminuição da competência do sistema imunológico, predispondo a infecções recorrentes (SIZER, 2003).

A palavra Kwashiorkor é decorrente de um dos dialetos de Gana, país localizado no continente africano, tendo como significado “espírito mau que infecta o primeiro filho quando o segundo nasce”, sendo que essa deficiência nutricional é provinda por dietas com elevada ingestão de carboidratos, porém com baixa ingestão proteica, paralelamente a baixa qualidade das próprias proteínas, sendo que, nesse caso, o consumo calórico total pode apresentar-se adequado (SIZER, 2003). Desta maneira, ela é caracterizada por baixa massa e estatura corporal, porém com menor extensão quando se comparada ao marasmo, havendo diminuição do tecido muscular, porém com preservação, ou até mesmo, aumento da gordura corporal, levando a uma estenose hepática, pele seca, úlceras frequentes, notória perda de apetite, sendo de classificação edematosa (SIZER, 2003).

Em paralelo existe a síndrome denominada marasmo com a Kwashiorkor, pode-se interpretar a primeira como apresentado forte relação com a inanição, culminando na utilização dos depósitos de gordura bem como das proteínas do tecidos musculoesquelético para manutenção da síntese de carboidratos e, conseqüentemente, da glicemia, sendo a segunda, como decorrente da ingestão insuficiente de proteínas paralelamente a ingestão levada de carboidratos (SIZER, 2003).

Visto as conseqüências geradas pela restrição de aminoácidos nas primeiras fases de desenvolvimento corporal, notoriamente, há poucos estudos que se propuseram há avaliar os efeitos do exercício físico após a recuperação nutricional. Os principais achados destas pesquisas foram uma alteração na cinética de lactato frente ao esforço agudo (VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2007), com

adaptação decorrente do treinamento crônico a cinética do lactato dada a uma carga de esforço (SANTHIAGO et al., 2006). Ademais, foi observada resposta da glicemia, insulina, proteínas totais e albumina, similar oxidação de glicose, porém, menor captação de glicose no músculo, maior utilização de glicogênio hepático, menor mobilização dos lipídeos hepáticos (ALMEIDA; MELLO, 2004).

Ainda, é notório o retardo do desenvolvimento da massa corporal, porém, há recuperação total do tamanho quando houve treinamento físico crônico (DE SANTANA MUNIZ et al., 2013). Esses exercícios físicos feitos de maneira contínua geraram aumento dos valores glicêmicos na condição basal (PRADA; MACEDO; MELLO, 2007), manutenção da concentração de colesterol total, triglicerídeos bem como das frações de HDL, LDL e VLDL (MUNIZ et al., 2013).

Visto que o exercício físico pode gerar adaptações positivas nos animais que passaram por uma dieta hipoproteica, basta saber se outros recursos podem auxiliar no processo de recuperação. Um dos recursos utilizados para melhora do desempenho físico é a fotobiomodulação, porém pouco se sabe dos seus efeitos quando um indivíduo passou por uma desnutrição proteica.

Desta maneira, pode ser que a fotobiomodulação, quando associada ao exercício físico possa acelerar o processo de recuperação dos efeitos deletérios da desnutrição, uma vez que esse recurso é capaz de melhorar a performance aeróbica, reduzindo o estresse oxidativo, diminuindo o índice de fadiga (DE MARCHI et al., 2012), diminuindo o nível sérico de lactato (ASSIS et al., 2015), aumentando o processo da angiogênese (ADABBO et al., 2016), estimulando as células satélites (FERRARESI; HAMBLIN; PARIZOTTO, 2012), aumentando a força muscular (FERRARESI; OLIVEIRA; ZAFALON, 2011), diminuindo os marcadores inflamatórios (ZAGATTO et al., 2016).

Assim, é necessário que pesquisas desmistifiquem se a fotobiomodulação, associada ou não ao exercício físico poderia auxiliar na recuperação do tecido musculoesquelético em situação de desnutrição e recuperação nutricional.

É presumível sugerir que, um inadequado funcionamento e desenvolvimento dos tecidos previamente citados decorrente de uma condição de desnutrição ou desnutrição e subsequente recuperação proteica, delineada, primariamente nos estágios iniciais e críticos do desenvolvimento de ratos, pode ser adicionalmente modulado de forma negativa, quando o exercício físico é prescrito sem adequado controle de carga de treinamento e condição nutricional.

Desta maneira, esta pesquisa visa sanar algumas lacunas no que diz respeito sobre o funcionamento metabólico frente ao exercício físico, associado ou não a fotobiomodulação em ratos desnutridos e recuperados nutricionalmente, ainda, quantificando os valores referentes a resistência muscular frente uma tração, visando esclarecer se a condição de desnutrição possa afetar a incidência e recuperação das lesões musculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADABBO, M. et al. Effects of Low-Level Laser Therapy Applied Before Treadmill Training on Recovery of Injured Skeletal Muscle in Wistar Rats. v. 34, n. 5, p. 1–7, 2016.

ALMEIDA, P. B. L. de; MELLO, M. A. R. de. Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n. 1, p. 17–30, 1 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rbefe/article/view/16548>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

ALVES, A. P.; DÂMASO, A. R.; DAL PAI, V. Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 3, p. 264–271, jun. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572008000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ASSIS, L. et al. Effect of low-level laser therapy (808 nm) on skeletal muscle after endurance exercise training in rats. v. 19, n. 6, p. 457–465, 2015.

ASSOCIAÇÃO SERGIPANA DE CIÊNCIA, G. et al. **Scientia plena**. [s.l.: s.n.]v. 10

CORTÉS-BARBERENA, E. et al. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 152, n. 3, p. 585–592, 29 mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18373698>>. Acesso em: 17 set. 2019.

DE MARCHI, T. et al. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 231–236, 8 jan. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10103-011-0955-5>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

DE SANTANA MUNIZ, G. et al. Early physical activity minimizes the adverse effects of a low-energy diet on growth and development parameters. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 113–124, 19 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320985>>. Acesso em: 17 set. 2019.

DEUTZ, N. E. P. et al. Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 929–936, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814383>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

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 in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 267–286, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/plm.2012.1.issue-4/plm-2012-0032/plm-2012-0032.xml>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

FERRARESI, C.; OLIVEIRA, T. D. B.; ZAFALON, L. D. O. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. **Lasers in Medical Science**, p. 349–358, 2011.

GÓMEZ SANTOS, F. Malnutrition. **Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (English Edition)**, v. 73, n. 5, p. 297–301, 1 set. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2444340917000413>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

GUERI, M.; GURNEY, J. M.; JUTSUM, P. The Gomez classification. Time for a change? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 5, p. 773–7, 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6975186>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

GURMINI, J. et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 271–278, ago. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442005000400009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 19 jan. 2019.

JERONIMO, L. C. et al. Morphological and Morphometric Study of the Muscle Fibers and Neuromuscular Junctions of the Extensor Digitorum Longus in Aged Rats Submitted to Maternal Protein Restriction. **International Journal of Morphology**, v. 34, n. 1, p. 396–403, mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022016000100057&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 8 dez. 2018.

LOCHS, H. et al. Introductory to the ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Terminology, Definitions and General Topics. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 180–186, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697086>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

LOPES, T. de S. et al. Protein Malnutrition Pre- and Postnatal and Nutritional Rehabilitation Modulates the Morphology of Muscle Fibers in Wistar Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, n. 3, p. 278–287, 4 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558017>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

ORGANIZATION, W. H. Levels & Trends in Child Mortality. **World Health Organization**, 2018. Disponível em: <<https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2018/09/UN-IGME-Child-Mortality-Report-2018.pdf>>.

PERTILLE, A. et al. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 83–91, 4 jul. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842017000100083&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 8 dez. 2018.

PEZOLATO, V. A. et al. Electrocardiographic profile of rats after malnutritional recovery. **Medicina (Brazil)**, v. 46, n. 3, 2013a.

- PEZOLATO, V. A. et al. Padrão eletrocardiográfico de ratos após recuperação nutricional. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 46, n. 3, p. 281, 18 set. 2013b. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/69140>>. Acesso em: 8 dez. 2018.
- PEZOLATO, V. A. et al. Perfil hematológico de ratos submetidos a desnutrição protéica e recuperação nutricional. **Biomotriz**, v. 9, n. 2, 13 dez. 2015. Disponível em: <<http://revistaelectronica.unicruz.edu.br/index.php/BIOMOTRIZ/article/view/1996>>. Acesso em: 8 dez. 2018.
- PEZOLATO, V. A. et al. Electrocardiographic monitoring in the development of Wistar rats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 69, n. 1, 2017.
- PRADA, F. J. A.; MACEDO, D. V.; MELLO, M. A. R. de. Oxidative stress during rehabilitation from protein malnutrition associated with aerobic exercise in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 45–55, jan. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132007000100006&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 9 jan. 2019.
- RENNÓ, A. C. M. et al. Comparative Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Low-Level Laser Therapy on Injured Skeletal Muscle. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 1, p. 5–10, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166589>>. Acesso em: 8 jan. 2019.
- RYTTER, M. J. H. et al. Social, dietary and clinical correlates of oedema in children with severe acute malnutrition: a cross-sectional study. **BMC Pediatrics**, v. 15, n. 1, p. 25, 22 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25885808>>. Acesso em: 8 dez. 2018.
- SANTHIAGO, V. et al. Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 2, p. 76–80, abr. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922006000200004&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- SIZER, F. S. **Nutrição : conceitos e controversias**. [s.l.] Manole, 2003.
- VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determinação da transição metabólica através do teste de lactato mínimo em ratos desnutridos durante o exercício de natação. **Revista da Educação Física**, v. 18, n. 1, p. 33–39, 2007.
- ZAGATTO, A. M. et al. Effects of low-level laser therapy on performance , inflammatory markers , and muscle damage in young water polo athletes : a double-blind , randomized , placebo-controlled study. **Lasers in Medical Science** p. 511–521, 2016.

HIPÓTESES

As hipóteses da presente tese são:

1. A desnutrição proteica seguida de recuperação nutricional pode deixar sequelas que possam limitar o desempenho físico, as quais podem ser revertidas através do uso da FBM.
2. A lesão muscular pode ser tratada ao realizar um programa de treinamento periodizado juntamente, ou não, com o uso da FBM, tanto em animais que consomem dieta normoproteica, quanto em animais que foram desnutridos e recuperados nutricionalmente.
3. A desnutrição proteica pode gerar rastros negativos na funcionalidade cardíaca, assim, o treinamento físico aeróbico seria capaz de reverter tais consequências, quando o treino for associado, ou não, com o uso da FBM.

OBJETIVO GERAL

Considerando que a desnutrição proteica gera sequelas no metabolismo energético, na condição cardíaca, nos marcadores bioquímicos sanguíneos, na deformação muscular, esta tese tem como objetivo averiguar se a FBM é capaz de reverter, ou minimizar tais efeitos, assim como o treinamento periodizado possa alterar essas sequelas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o perfil de crescimento dos animais, assim como o peso dos órgãos, tanto no ambiente de desnutrição e recuperação nutricional, quanto no ambiente com ingesta normoproteica.

2. Avaliar a cinética do lactato frente ao exercício físico em animais que passaram por desnutrição, definindo o limiar de lactato para exercícios aeróbicos.
3. Avaliar a cinética de lactato frente ao exercício físico associado a FBM.
4. Avaliar as reservas de glicogênio frente a desnutrição e recuperação nutricional, tanto no ambiente de treinamento físico de longa duração, associado ou não a FBM, como também com lesões musculares.
5. Avaliar se a desnutrição proteica seguida da recuperação nutricional pode acarretar em sequelas no que diz respeito da resistência muscular frente a um teste de tração mecânico.
6. Avaliar se a FBM é capaz de melhorar a resistência muscular a tração, como também a deformação muscular.
7. Avaliar o perfil eletrocardiográfico em animais que passaram por desnutrição proteica e recuperação nutricional e averiguar a resposta do exercício físico, associado ou não a FBM, nesses parâmetros.

SEGUNDA PARTE

Estudo I: Respostas físicas e metabólicas de ratos desnutridos recuperados em relação ao exercício aeróbico com e sem associação da laserterapia.

Submetido: Lasers in Medical Science”, em 12 de janeiro de 2019, sob a referência LIMS-D-19-00022

Estudo II: Efeitos da fotobiomodulação na lesão muscular, associado ao treino aeróbico periodizado em animais desnutridos e recuperados nutricionalmente.

Submetido: Journal of Photochemistry & Photobiology”, em 21 de janeiro de 2019, sob referência JPHOTOBIOL_2019_85

Estudo III: Acompanhamento da condição cardíaca frente ao exercício aeróbico com periodização linear, associado ou não a fotobiomodulação em ratos desnutridos e recuperados nutricionalmente.

2. Estudo I

Respostas físicas e metabólicas de ratos desnutridos recuperados em relação ao exercício aeróbico com e sem associação da laserterapia

Submetido: Lasers in Medical Science”, em 12 de janeiro de 2019, sob a referência

LIMS-D-19-00022

Respostas físicas e metabólicas de ratos desnutridos recuperados em relação ao exercício aeróbico com e sem associação da laserterapia

Vitor Alexandre Pezolato¹, Rodrigo Dias², Ana Laura Martins de Andrade¹, Rafael Henrique Staiger³, Francielly Stefani Ramos⁴, Carlos Alberto da Silva⁵, Nivaldo Antonio Parizotto⁶

1. Doutorado de Fisioterapia pela Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, SP.
2. Professor Titular da Educação Física da Associação de Ensino Superior do Piauí, AESPI, PI.
3. Aluno de Iniciação Científica em Biomedicina na Faculdade Integrada Einstein de Limeira - FIEL, SP.
4. Aluna de Iniciação Científica em Fisioterapia na Faculdades Integradas Einstein de Limeira - FIEL, SP
5. Professor Titular de Fisioterapia pela Universidade Paulista - UNIP, SP.
6. Professor Titular da Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, SP.

ENDEREÇO:

Universidade Metodista de Piracicaba – Rodovia do Açúcar, km156 (SP-308)

CEP: 13,423-170 – Piracicaba, SP – Brasil

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – Rodovia Washington Luis, Km 235 (SP-310)

CEP: 13,565-905 – São Carlos, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Vitor Alexandre Pezolato

Vitor.pezolato@gmail.com

RESUMO

A subnutrição, mais comumente conhecida como desnutrição, é definida como uma condição na qual o organismo apresenta desequilíbrio e/ou deficiência energética. Estudos experimentais que avaliam as condições do exercício físico em organismos subnutridos tem sido destacado na literatura com o objetivo de avaliar o impacto dessa condição na recuperação proteica e na performance do exercício. Este estudo buscou avaliar o impacto da subnutrição no exercício físico aeróbico associado ou não a fotobiomodulação (PBM), sendo este recurso amplamente discutido na literatura sobre seus efeitos no exercício físico. Sessenta e três ratos Wistar foram utilizados, sendo divididos em seis grupos, controle (C), controle treinado (CT), controle treinado e irradiado pela PBM (CTLa), desnutrido recuperado (DR), desnutrido recuperado treinado (DRT), desnutrido recuperado e irradiado pela PBM (DRTLla). Foi utilizada esteira ergométrica para os grupos treinados e um laser infravermelho (780nm) para os grupos irradiados. As avaliações realizadas foram determinação da performance física, determinação de lactato e concentração de glicogênio. Para a performance física foi observado que os grupos irradiados apresentaram resultados superiores aos demais grupos e com relação ao nível de lactato os grupos treinados associados ou não a PBM, apresentaram valores superiores aos demais. Na avaliação do glicogênio hepático foi observado melhores resultados para os grupos que passaram pelo processo de desnutrição treinados associados ou não a PBM. Assim este estudo demonstrou que os efeitos deletérios da desnutrição podem não interferir na performance física e que a associação da PBM com o exercício é capaz de melhorar a resistência do indivíduo.

Palavras-Chave: desnutrição, exercício, fotobiomodulação

ABSTRACT

Malnutrition is defined as a condition in which the body is unbalanced and/or energy deficient. Experimental studies that evaluate the conditions of physical exercise in undernourished organisms have been highlighted in the literature with the objective of evaluating the impact of this condition on the protein recovery and exercise performance. This study aimed to evaluate the impact of malnutrition on aerobic physical exercise associated or not with Photobiomodulation (PBM), being this resource widely discussed in the literature about its effects on physical exercise. Sixty-three Wistar rats were divided into six groups, control (C), trained control (CT), trained and irradiated control by PBM (CTLa), Recovered malnourished (DR), recovered malnourished trained (DRT), malnourished recovered and irradiated by PBM (DRTL_a). An Ergometric treadmill was used for the trained groups and an infrared laser (780nm) for the irradiated groups. The evaluations were determination of physical performance, determination of lactate and glycogen concentration. For the physical performance it was observed that the irradiated groups presented superior results to the other groups and in relation to the lactate level the trained groups associated or not the PBM presented values higher than the others. In the evaluation of the hepatic glycogen, better results were observed for the groups that underwent the process of malnutrition trained with or without PBM. Thus, this study demonstrated that the deleterious effects of malnutrition may not interfere with physical performance in trained individuals and that the association of PBM with exercise is capable of improving the individual's resistance.

Keywords: malnutrition, exercise, photobiomodulation

INTRODUÇÃO

A subnutrição, mais comumente conhecida como desnutrição, é definida como uma condição na qual o organismo apresenta desequilíbrio e/ou deficiência energética dos reconhecidos macronutrientes como proteínas, carboidratos e/ou lipídeos e/ou micronutrientes (LOCHS et al., 2006). Tal condição, induz diferenciadas magnitudes no que diz respeito a deficiência da massa e estatura corporal bem como retardo no desenvolvimento neuropsicomotor (WHO, 2018) e outras alterações clínicas associadas ao próprio desequilíbrio e/ou deficiência energética (DEUTZ et al., 2014; RYTTER et al., 2015; BOURKE; BERKLEY; PRENDERGAST, 2016; WHO, 2018).

Essas sequelas podem sofrer alterações quando é associado o exercício físico concomitante a própria ingestão proteica equilibrada, os quais são considerados como componentes primordiais para a otimização da função muscular ao longo do processo de desenvolvimento corpóreo na infância (DEUTZ et al., 2014).

Em meio a preocupação frente as elevadas taxas de mortalidade infantil, decorrentes da desnutrição, recentemente demonstradas pela World Health Organization (WHO) (ORGANIZATION, 2018), tem sido enaltecido em diversos estudos com animais experimentais que as proteínas são constituintes importantes para a homeostasia celular, sendo que, a deficiência na ingestão e/ou absorção via estabelecimento de uma condição de desnutrição delineada primariamente nos estágios iniciais e críticos do desenvolvimento, potencialmente modula de maneira negativa o funcionamento e/ou desenvolvimento dos mais variados tecidos (PEZOLATO et al., 2013; JERONIMO et al., 2016; LOPES et al., 2017; WHO, 2018).

Os estudos que se propuseram a avaliar os efeitos da recuperação proteica subsequente a condição de desnutrição delineada primariamente nos estágios iniciais e críticos do desenvolvimento em animais experimentais, tem demonstrado, recuperação total, parcial ou até mesmo nenhum indício de recuperação no que diz respeito ao funcionamento e/ou desenvolvimento dos mais variados tecidos (PIMENTEL et al., 2013; PEZOLATO et al., 2015; JERONIMO et al., 2016; PERTILLE et al., 2016; LOPES et al., 2017).

Poucos tiveram como foco o impacto do exercício físico sobre as modulações agudas e/ou adaptações crônicas frente as referidas condições nutricionais, e, ainda

assim, não inferindo nenhuma análise no que diz respeito as possíveis estratégias relacionadas a fotobiomodulação em associação ao exercício.

Essa desnutrição proteica quando inserida nos estágios iniciais do desenvolvimento, por mais que haja recuperação nutricional, gerou consequências de menor captação de glicose no musculo sóleo, menor mobilização dos lipídeos hepáticos e da albumina após esforço agudo, porém houve a normalização do peso e tamanho corporal (OLIVEIRA et al., 2015). No entanto, não há estudos que realizaram uma comparação do desempenho físico de animais que passaram pelo processo de desnutrição e recuperação nutricional com animais que se alimentaram com dietas normoproteica.

Já a fotobiomodulação (FBM), vêm sendo utilizada na prática clínica para melhora da resistência muscular a fadiga frente a atividade física, mostrando diminuição de marcadores de dano muscular creatina quinase (CK), do lactato desidrogenase (LDH), do aumento de estimulação mitocondrial, principalmente da citocromo C Oxidase, melhorando os índices de fadiga muscular e desempenho físico, principalmente, aeróbico (FERRARESI; HAMBLIN; PARIZOTTO, 2012). Ainda, não há estudos demonstrando o efeito da fotobiomodulação em um organismo afetado pela desnutrição proteica.

Esse estudo teve como objetivo averiguar se a desnutrição proteica, seguida de uma recuperação nutricional pode deixar lastros agravantes na performance durante a atividade física aeróbica e caso haja, mensurar se a FBM é capaz de melhorar o perfil metabólico, conseqüentemente, o desempenho físico tanto na condição de dietas hipoproteicas quanto normoproteicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais Experimentais

Foram utilizados 70 ratos da linhagem *Wistar* (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), desmamados no 21º dia de vida, provenientes da empresa *Anilab*® (Paulínia-SP). Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas coletivas contendo 5 e 7 animais por gaiola para os animais submetidos a adequada condição nutricional proteica e aos animais submetidos a condição de desnutrição/recuperação proteica, respectivamente.

Ademais, os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 ± 2 °C e iluminação adequada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6:00 horas. Ressalta-se que, com relação à limpeza das gaiolas, foi adotado o procedimento de se transferir pequena porção do material da gaiola suja (maravalha com fezes e urina) para a gaiola limpa, sendo em seguida, adicionada mais maravalha limpa e realizada a homogeneização da maravalha objetivando a manutenção das marcas olfatórias e conseqüentemente a estabilidade da hierarquia social dos animais em cada gaiola, reduzindo possíveis picos de estresse (RODRIGUES et al., 2013).

Ainda, durante todo o período experimental, os animais foram continuamente expostos de forma sistemática/organizada a diferenciadas condições de ambiente enriquecido, considerando orientações previamente publicadas (RODRIGUES et al., 2013), a fim de minimizar a monotonia da confinção e proporcionar maior possibilidade de interações naturais da espécie no que diz respeito as questões ambientais e sociais. Reconhecidamente, a condição de ambiente enriquecido, apresenta potencial para minimizar o nível de estresse e, conseqüentemente, aumento das possibilidades de obtenção de animais mais estáveis com relação aos parâmetros fisiológicos e psicológicos (SIMPSON; KELLY, 2011), assegurando melhores resultados científicos.

Os animais foram tratados de acordo com as recomendações do *Guide for Care Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996), sendo o trabalho aprovado pela Comissão de Experimentação Animal da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) sob protocolo de número 04/16.

Grupos Experimentais

Após o período de desmame dos animais, os mesmos foram aleatoriamente divididos em 10 grupos, contendo 7 animais em cada, assim denominados: Controle (C), Controle 45 dias (C45), Controle 90 dias (C90), Controle Treinado (CT), Controle Treinado e Irradiado (CTLa), Desnutrido 45 dias (DR45), Desnutrido Recuperado 90 dias (DR90), Desnutrido Recuperado (DR), Desnutrido Recuperado Treinado (DRT), Desnutrido Recuperado e Irradiado (DRTLla).

Desenho Experimental

Inicialmente os grupos C45, C90, C, CT, CTLa passaram pela dieta normoprotéica (AN 93 M 14%) durante todo o experimento e os grupos DR45, DR90, DR, DRT, DRTLla, passaram por uma dieta hipoprotéica (AN 6%) por 45 dias, causando o estado de desnutrição proteica e foram recuperados com dieta normoprotéica durante 45 dias.

Os grupos C45 e DR45 passaram pelas coletas no dia 45 de experimento, sendo que os grupos C90 e DR90, passaram pelas coletas no dia 90 de experimento.

Os grupos CT, CTLa, DRT e DRTLla, ao atingirem o 83º dia de experimento, os grupos passaram por um protocolo de adaptação na esteira e, posteriormente, por um programa de treinamento físico, o qual se inicia no dia 90º e dura 36 dias.

Os grupos CTLa e DRLa receberam irradiação de laser de baixa intensidade após cada sessão de treinamento. Vide Figura 1 para melhor visualização do desenho experimental.

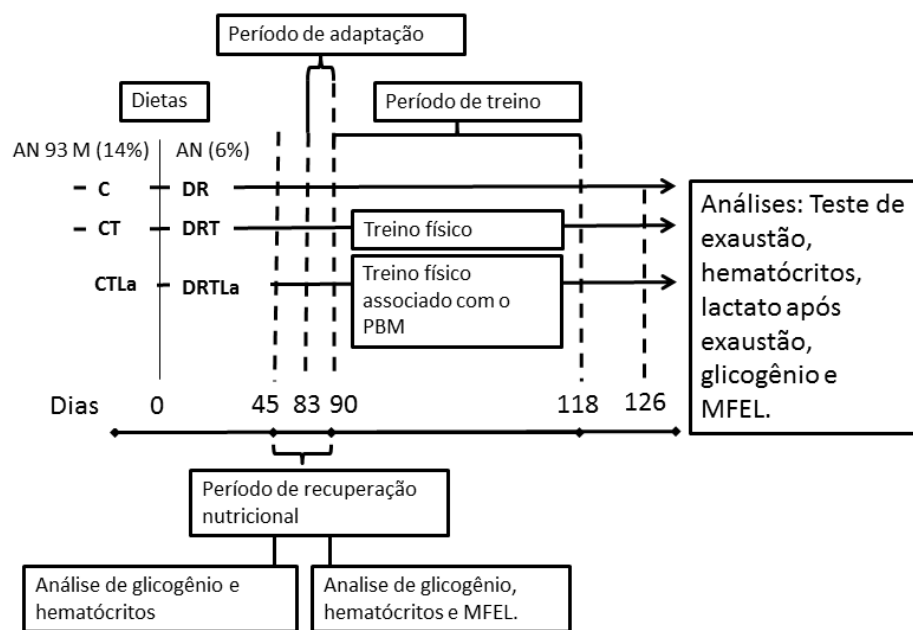


Figura 1 - Desenho experimental, seguindo uma linha temporal com as análises que foram realizadas em cada momento.

Protocolo de Desnutrição e Recuperação Nutricional

Os animais dos grupos C45, C90, C, CT e CTLa foram alimentados com dieta normoproteica AIN 93 M, contendo 14% de proteína, enquanto os animais dos grupos DR45, DR90 DR, DRT, DRTLla foram alimentados com dieta hipoproteica AN contendo 6% de proteína por 45 dias, alimento comercializado pela PragSoluções Serviços e Comércio Ltda; CNPJ: 03.420.938/0001-59 / IE 401.091.476.112-ME.

Posteriormente, os animais passaram pelo processo de recuperação nutricional, sendo alimentados com dieta normoproteica AIN 93 M, contendo 14% de proteína pelo período de 45 dias. As composições das referidas dietas estão previamente descritas (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição recuperação nutricional.

<i>Dieta AN 93 M -14%</i>		<i>Dieta AN - 6% proteína (desnutrição)</i>	
Ingredientes	p/1 Kg	Ingredientes	p/1 Kg
Amido de milho	465.700	Amido de milho	508.000
Caseína	140.000	Caseína	66.000
Amido dextrinizado	155.000	Amido dextrinizado	166.500
Sacarose	100.000	Sacarose	121.000
Óleo de soja	40.000	Óleo de soja	40.000
Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000	Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000
L-cistina	1.800	L-cistina	1.000
Cloreto colina	2.500	Cloreto colina	2.500
Mix mineral G	35.000	Mix mineral G	35.000
Mix vitamínico	10.000	Mix vitamínico	10.000
TOTAL	1000.0	TOTAL	1000.0

Esteira e Adaptação dos Animais

Para realizar os programas de treinamento físico, foi utilizada uma esteira ergométrica da marca Rebook TR2 Premierrun Treadmill® (Adidas do Brasil, Embú, SP, Brasil), apresentando 8 raias, com marcação de velocidade em metros por minuto (m/min) e inclinação automática. Os animais receberam treinamento passaram pela adaptação na esteira na última semana de recuperação nutricional representando os dias 83 até o dia 90 de experimento. O protocolo de adaptação consistiu na colocação dos animais na esteira durante uma semana, sem inclinação, com aumento progressivo da velocidade até alcançar 18m.min⁻¹ (valor médio da primeira semana de treinamento), com aumento progressivo do tempo de corrida até alcançar 15 minutos.

Programa de Treinamento Físico Periodizado com Polimento Linear

O protocolo de treinamento aeróbio foi realizado diariamente, de segunda-feira a sexta-feira, durante 36 dias, no período da tarde. Este protocolo apresenta periodização do volume e da intensidade obedecendo períodos de descanso ativo (Tabela 2).

Esta graduação tem o intuito de possibilitar uma adaptação dos animais ao treinamento, preconizando, assim, um predomínio do treinamento aeróbio. Sua intensidade foi calculada seguindo os níveis de lactato encontrado nos estudos de Ferreira et al. (2007) e Brito-Vieira et al. (2014) e no teste de máxima fase estável de lactato (MFEL).

Tabela 2 - Protocolo de treinamento, demonstrando a duração do treino em minutos, velocidade em metros por minuto ($m \cdot min^{-1}$) e a carga de treino.

Dia	Volume (min)	Intensidade ($m \cdot min^{-1}$)	Carga de treino (Volume x intensidade) = u.a.)
1	20	16	320
2	30	17	510
3	40	18	720
4	45	19	855
5	50	20	1000
6	0	-	-
7	0	-	-
8	60	20	1200
9	60	20	1200
10	60	20	1200
11	60	20	1200
12	60	22	1320
13	0	-	-
14	0	-	-
15	60	22	1320
16	60	24	1440

17	60	22	1320
18	60	24	1440
19	60	22	1320
20	0	-	-
21	0	-	-
22	60	24	1440
23	60	24	1440
24	60	24	1440
25	60	24	1440
26	60	24	1440
27	0	-	-
28	0	-	-
29	0	-	-
30	50	24	1200
31	40	24	960
32	35	24	840
33	30	24	720
34	25	24	600
35	0	-	-
36	0	-	-

O início do treinamento foi realizado com carga de trabalho menor (10% de velocidade e tempo predeterminados para o dia) como forma de aquecimento, conforme previamente preconizado (SIU et al., 2003).

Fotobiomodulação

Foi utilizado o laser de baixa intensidade GaAlAs (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil), sendo este calibrado e aferido antes do procedimento experimental, seguindo os parâmetros do estudo de Brito-Vieira et al. (2012) (Tabela 3).

As irradiações foram realizadas de modo pontual, no ventre muscular do tibial anterior imediatamente após as sessões do exercícios físicos, visando aproveitar as condições de “estresse físico” e, conseqüentemente, de alterações metabólicas do

animal, tendo em vista maior eficácia do laser nessas condições (FERRARESI et al., 2015).

Todos os animais foram tricotomizados na região em que receberam as irradiações, e durante a aplicação foi utilizada uma manta de algodão para conter o animal.

Tabela 3 - Parâmetros de aplicação do laser de baixa intensidade GaAIs

Parâmetros	Valores
Potência (mW)	70
Comprimento de Onda (nm)	780
Mode de Aplicação	Contínuo
Área transversa de saída do laser (cm ²)	0.04
Densidade de energia (J/cm ²)	214
Tempo (s)	122
Energia (J)	8,54

Determinação do Peso

Semanalmente, os animais foram pesados através da balança digital (Indústria Filizola, São Paulo, SP, Brasil).

Determinação do Desempenho Físico

Para a determinação do desempenho físico, o mesmo foi avaliado inicialmente sob a perspectiva da máxima fase estável de lactato (MFEL), seguindo os parâmetros já publicados (FERREIRA et al., 2007; BRITO VIEIRA et al., 2014) via cinética do lactato a uma carga específica de esforço.

A máxima fase estável de lactato foi feita nas velocidades 20m/min⁻¹, 22m/min⁻¹ e 24m/min⁻¹, assim era o lactato no iniciou da MFEL e a cada 5 minutos de treino até completar 25 minutos.

Houve também a avaliação do desempenho físico a partir de um teste de exaustão que se caracteriza nos animais realizarem exercício físico na esteira ergométrica na intensidade de 20 m/min⁻¹ pelo maior tempo possível, sendo que a exaustão foi definida como ponto em que os animais estavam incapazes de continuar a passada contínua durante 1 minuto (CALDERS et al., 1999). Ao final do teste de exaustão foi mensurado a concentração de lactato sanguíneo.

Determinação da Concentração Circulante de Lactato e Hematócritos

Para a determinação da concentração circulante de lactato, foi realizada um corte na extremidade distal da cauda dos animais, em cerca de 2 mm ao final da mesma, sendo posteriormente procedida uma massagem na cauda no sentido do ânus até o fim da cauda, para puncionar uma gota de sangue, o qual foi coletado para realizar a máxima fase estável de lactato e ao final do teste de exaustão, considerando orientações previamente publicadas (RODRIGUES et al., 2013), sendo, para tanto, utilizado um lactímetro digital portátil e respectivas fitas da marca *Roche*[®] (Produtos Roche Químico e Farmacêuticos, São Paulo, SP, Brasil), com os resultados expressos em mmol/L.

Para a determinação do hematócrito foi preenchido um capilar heparinizado da marca *Perfecta*[®]-Brasil, com aproximadamente 75% do volume total e realizada a centrifugação do mesmo por 5 minutos em aparelho da marca *Fanem 241*[®] (Fanem, São Paulo, SP, Brasil), com os resultados interpretados por meio da utilização do cartão de leitura de hematócrito da marca *Fanem*[®] (Fanem, São Paulo, SP, Brasil), sendo os resultados expressos em porção relativa (%) do componente sólido do sangue em comparação ao plasma. Essa metodologia foi realizada, seguindo cuidados e especificações padrão (BANFI; DOLCI, 2003).

Determinação do Conteúdo de Glicogênio

Para coleta das amostras, os ratos foram anestesiados com mistura de cloridrato de ketamina (*Dopalen*[®])(Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínea, SP, Brasil), e cloridrato de xilazina (*Rompun*[®])(Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil), via intraperitoneal, considerando as orientações previamente publicadas de 0,1mL.100g⁻¹ e 0,07mL.100g⁻¹, respectivamente (RODRIGUES et al., 2013). Sendo confirmado a inexistência de estímulos dolorosos, procedeu-se a decapitação e retirada dos tecidos, os quais foram congelados no biofreezer à -70°C.

Para determinação do conteúdo de glicogênio, após o descongelamento das amostras do fígado, músculo cardíaco, diafragma, sóleo, gastrocnêmio (porção branca e vermelha) e tibial anterior, as mesmas foram submetidas à digestão em hidróxido de potássio (KOH) 30% a quente e o glicogênio foi precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, com o glicogênio submetido à

hidrólise ácida na presença de fenol, considerando orientações previamente publicadas (LO; RUSSELL; TAYLOR, 1970a), sendo os resultados expressos em mg/100mg de tecido úmido.

Análise Estatística

Os dados coletados foram tabulados e posteriormente analisados pelo *software* estatístico “GraphPad Prism 7”. A análise estatística foi procedida pela aplicação do teste Shapiro-Wilk para verificação da normalidade.

Os dados que se demonstraram paramétricos passaram pela análise de variância de uma via (one-way ANOVA), quando foi o caso, de duas vias (two-way ANOVA) seguido do teste de Tukey, enquanto as variáveis que se demonstrarem não paramétricas passaram pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de $p < 0,05$ para significância estatística.

RESULTADOS

Massa Corporal

	C vs. DR	C vs. CT	C vs. DRT	C vs. CTLa	C vs. DRTL	DR vs. CT	DR vs. DRT	DR vs. CTLa	DR vs. DRTL	CT vs. DRT	CT vs. CTLa	CT vs. DRTL	DRT vs. CTLa
valor ajustado de p	0	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9
	45	<0,0001	0,0013	<0,0001	0,9998	<0,0001	>0,9	<0,0001	>0,9	<0,0001	0,0034	<0,0001	<0,0001
	90	<0,0001	0,6278	<0,0001	0,9622	<0,0001	<0,0001	0,9976	<0,0001	0,9636	<0,0001	0,9773	<0,0001
	126	<0,0001	0,1265	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,6952	0,0065	0,9102	<0,0001	0,002	<0,0001	<0,0001

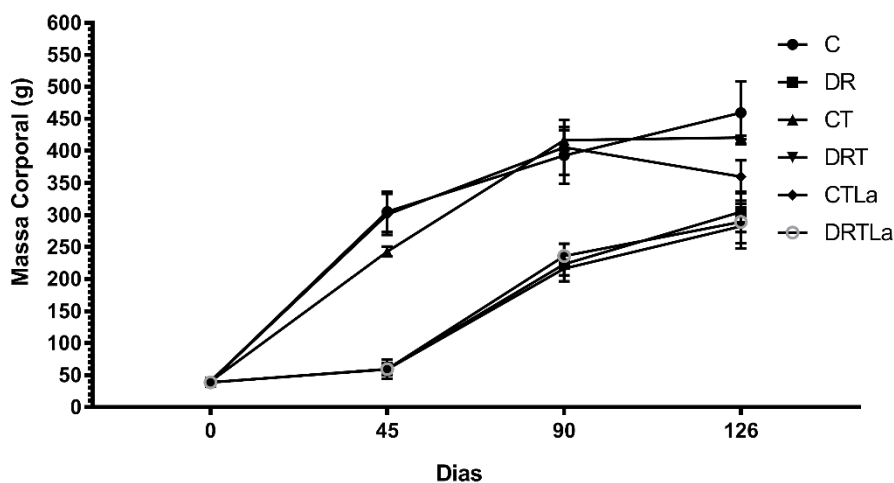


Figura 2 - Massa corporal dos animais ao longo do tempo juntamente com os valores ajustado de p.

Ao analisarmos a massa corporal, é visível que houve diferença estática entre os grupos C, CT, CTLa em relação aos grupos DR, DRT e DRTL, desde 45 dias até completarem 90 dias, sugerindo que a desnutrição ocorreu nos primeiros 45 dias de

experimento e que mesmo que esses animais passem por uma recuperação nutricional, a massa corporal não é completamente recuperada ($p < 0,05$; Figura 2), mostrando uma diferença de 44,71% entre o peso médio dos grupos que passaram por desnutrição e recuperação nutricional em relação aos que não passaram. Ainda, após o treinamento físico, associado ou não com a PBM, os grupos que passaram por desnutrição proteica não se igualam aos grupos que tiveram nutrição normal, por mais que tenham aumentado o peso ($p < 0,05$; Figura 2). Por fim, o CTLa teve diferença estatística dos C e CT, demonstrando que a PBM influenciou diretamente na diminuição da massa corporal quando associado ao exercício ($p < 0,05$; Figura 2).

MFEL

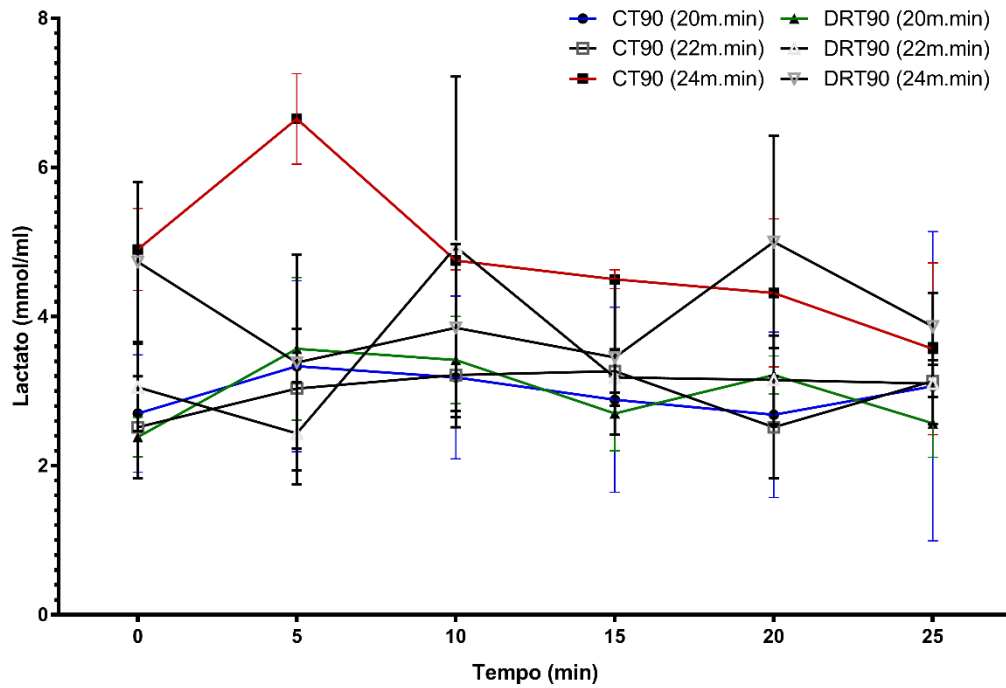
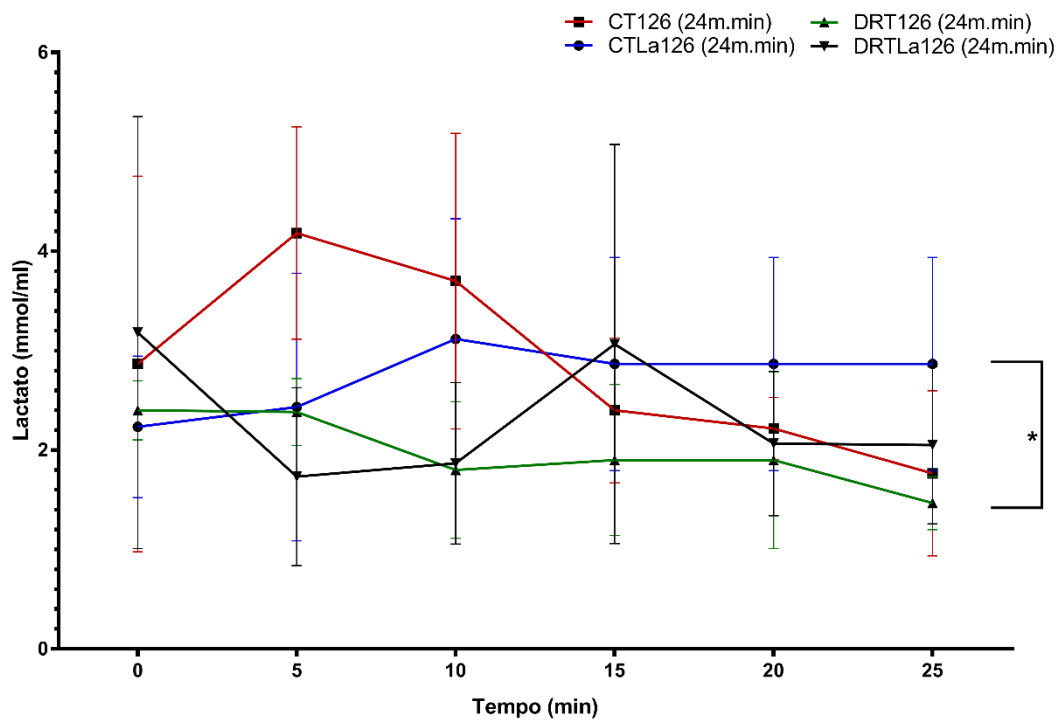
A**B**

Figura 3 - A: Máxima fase estável de lactato em diferentes velocidades ($20\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $22\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $24\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) no dia 90 de experimento. B: Máxima fase estável de lactato no com $24\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ no dia 126 de experimento. * $p < 0,05$ entre os grupos.

Na figura 3-A, mostra a expressão das curvas de lactato sanguíneo dos ratos submetidos ao exercício físico aeróbico na esteira, após a fase de adaptação. O teste MLSS foi feito para adquirir o valor correto da intensidade que deveria começar o treino periodizado dos animais, desta maneira foi feito três velocidades diferentes tanto para o grupo CT90 (controle treinado, representado o dia 90 de experimento), quanto para o grupo DRT90 (Desnutrido e recuperado treinado, representado o dia 90 de experimento), sendo elas: 20m.min, 22m.min, 24m.min. Ao final do teste não houve diferença estatística entre os grupos, ainda, o nível de lactato encontrado está próximo à 3,87 mmol/ml, como definido por Barro Machado et al. (2006), para preconizar que o exercício está sendo aeróbico.

Já na Figura 3-B, foi feito a MFEL para averiguar que no final do período de treinamento, os ratos ainda estivessem realizando exercícios aeróbicos e se os valores de Lactato sérico diminuiriam ao longo do treino. Desta maneira, não foi vista diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos CT90 (24m.min) e DRT90 (24m.min) em relação aos grupos que completaram o treinamento físico aeróbico, tanto com auxílio ou sem da PBM (CT126, CTLa126, DRT126, DRTL126). Houve apenas diferença estatística ($p = 0,0422$) entre os CTL126 e DRTL126.

Nível sérico de Hematócritos:

A porcentagem relativa do hematócrito no sangue teve diferença significativa apenas ao se comparar os animais do grupo DR, DRT e DRTL126, cujo estavam no final do processo de desnutrição proteica, representado pelo dia 45 de experimento, em relação aos grupos C, CT, CTL126 ($p < 0,0001$), demonstrando que o nível de hematócrito é recuperado ao longo da recuperação nutricional e ao realizar atividade física aeróbica, tanto com PBM, quanto sem, esse nível não foi alterado em nenhum dos grupos ($p > 0,05$), como visto na Figura 4-A.

Teste De Exaustão E Nível De Lactato Sérico:

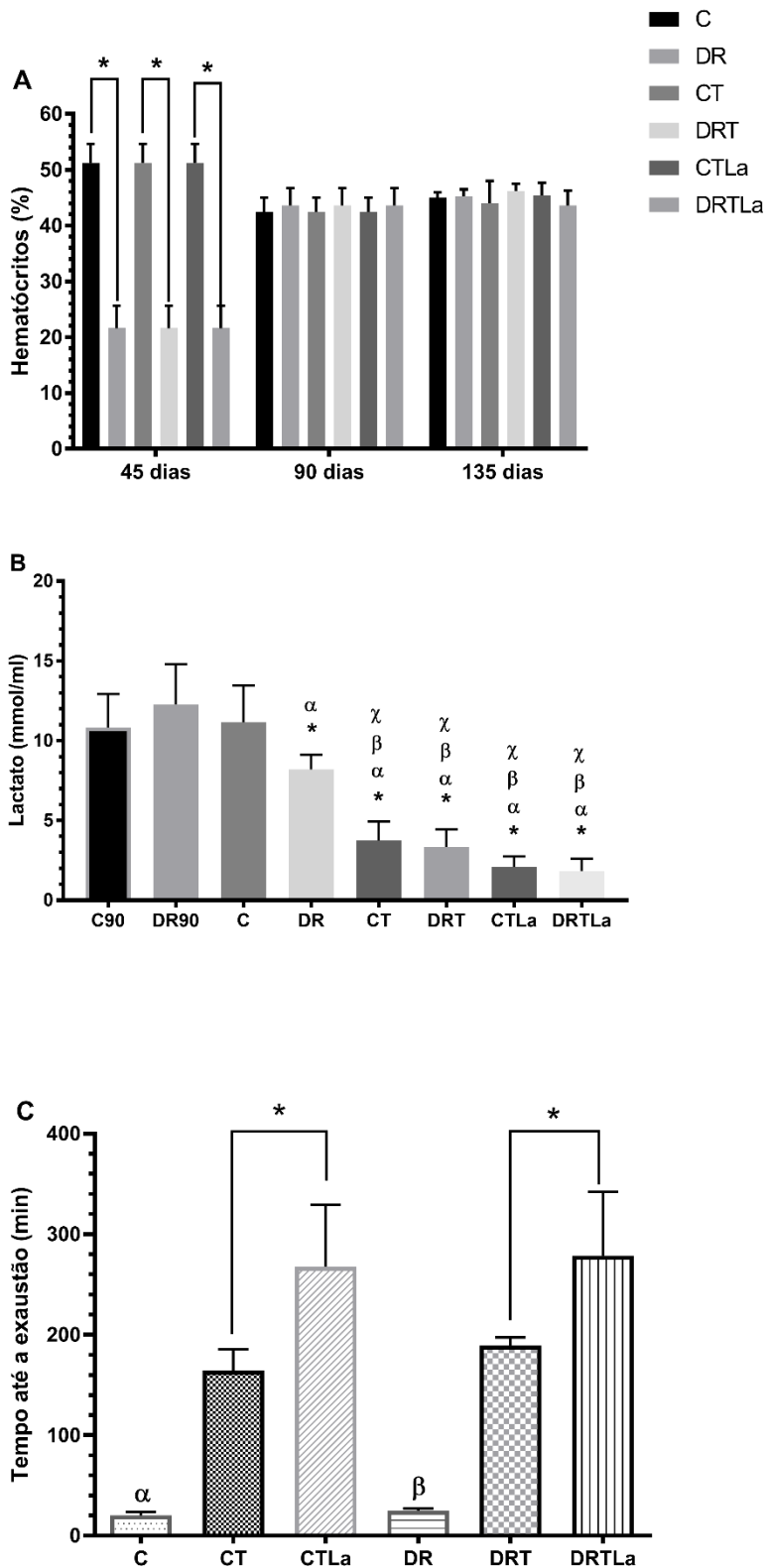


Figura 4 - A: demonstra o nível de hematócrito no sangue (%) nos dias 45, 90 e 129 de experimento, sendo * diferença estatística entre os grupos com $p < 0,05$. B: demonstra o valor de lactato sérico (mmol/ml) no final do teste de exaustão, sendo * $p < 0,05$ com diferença estatística em relação ao grupo C90; α $p < 0,05$ em relação ao grupo DR90; β $p < 0,05$ em relação ao grupo C; χ $p < 0,05$ em relação ao grupo DR. C: Tempo até a exaustão (min), sendo * $p < 0,05$ com diferença estatística em relação ao grupo C90; α $p < 0,05$ em relação ao grupo DR90; β $p < 0,05$ em relação ao grupo C.

No teste de exaustão (Figura 4-C), foi possível quantificar a performance dos animais frente ao exercício físico aeróbico, desta maneira é visível que os grupos sedentários C e DR, tiveram resultados com diferença significativa em relação aos grupos treinados ($p < 0,0001$ em relação a essas comparações), demonstrando resultados de baixa performance aeróbica, sendo que ao final do teste, quando foi feita a análise de lactato (Figura 4-B). Este estava com valores elevados (acima de 3,87 mmMol/ml) nos grupos C90, DR90, C e DR, demonstrando que o exercício estava sendo anaeróbico. Ainda, por mais que no teste de exaustão não apresente diferença estatística entre o grupo C e DR, os níveis de lactato do DR foram menores (C vs DR; $p = 0,0019$).

Ainda, o teste de exaustão (Figura 4-C) demonstrou que os grupos CT e DRT não apresentaram diferença estatística ($p = 0,963$), nem no nível sérico de lactato ($p > 0,999$) (Figura 4-B), sugerindo que a desnutrição seguida da recuperação nutricional não influencia os resultados relacionados a performance aeróbica.

Finalmente, os grupos CTLa e DRTL a, demonstram que a irradiação pode melhorar a performance, visto que apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação aos grupos CT e DRT (CT vs CTLa; $p = 0,0031$, com melhora de 78,65% e DRT vs DRTL a; $p = 0,0154$, com melhora de 63,68%), no teste de exaustão (Figura 4-C). Vale ressaltar que não foi demonstrado diferença significativa ao se comparar o nível de lactato destes grupos (Figura 4-B).

Tabela 4 - Glicogênio dos tecidos musculoesquelético, coração e fígado em mg/100mg.

Grupos	Coração	GB	GV	Sóleo	Tibial anterior	Diafragma	Fígado
C45	0,34±0,09	0,22±0,19	0,33±0,7	0,57±0,25	0,50±0,19	0,28±0,12	3,35±0,71
DR45	0,12±0,01	0,17±0,08	0,15±0,01	0,13±0,02	0,15±0,01	0,1±0,01	0,92±0,09
C90	0,13±0,01	0,58±0,08	0,38±0,02	0,34±0,01	0,36±0,02	0,14±0,01	2,97±0,33
DR90	0,27±0,02	0,33±0,03	0,56±0,12	0,58±0,09	0,42±0,06	0,44±0,08	3,65±0,60
C	0,17±0,01	0,33±0,05	0,33±0,06	0,37±0,02	0,32±0,05	0,16±0,04	2,62±0,07
DR	0,24±0,03	0,43±0,04	0,34±0,03	0,46±0,05	0,38±0,03	0,25±0,02	2,96±0,73
CT	0,16±0,01	0,19±0,04	0,16±0,02	0,14±0,01	0,05±0,02	0,1±0,02	0,9±0,04
DRT	0,22±0,03	0,17±0,02	0,21±0,03	0,25±0,04	0,20±0,03	0,10±0,02	2,04±0,09
CTLa	0,18±0,02	0,3±0,01	0,39±0,01	0,38±0,03	0,39±0,05	0,26±0,09	1,3±0,14
DRTL	0,24±0,03	0,27±0,02	0,41±0,04	0,41±0,04	0,41±0,03	0,28±0,09	2,51±0,20

Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Gastrocnêmio Branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV).

Inicialmente, o glicogênio do miocárdio (Tabela 4) se apresentou baixo no DR45 em relação ao C45 ($p=0,0008$), demonstrando que a desnutrição proteica gera efeitos deletérios no metabolismo cardíaco. No entanto, a recuperação nutricional foi feita e não houve diferença entre os grupos C90, DR90, C e DR ($p>0,05$).

Não houve diferença estatística em relação ao glicogênio do coração nos entre os grupos C, CT, CTLa, DR, DRT e DRTL (Tabela 4).

Em relação ao músculo gastrocnêmio (branco e vermelho), tibial anterior, sóleo e diafragma, foi visto que valores baixos e estatisticamente significativos ($p<0,05$) quando se comparou o DR45 com o C45. No término da recuperação nutricional, dado pelo dia 90 de experimento, foi possível analisar que não houve recuperação do glicogênio nos músculos GB, Sóleo e diafragma ao se comparar o C90 com DR90 ($p<0,05$). Ao contrário dos músculos GV e tibial anterior ($p>0,05$) (Tabela 4).

Gastrocnêmio Branco: A análise do gastrocnêmio porção branca houve diferença estatística entre os grupos: C vs DRT ($p=0,0046$), DR vs CT ($p=0,0002$) e DR vs DRT ($p<0,0001$) (Tabela 4).

Gastrocnêmio Vermelho: A análise do gastrocnêmio porção vermelha houve diferença estatística entre os grupos: C vs CT ($p=0,0005$), C vs DRT ($p=0,0222$), DR

vs CT ($p=0,0111$), CT vs CTLa ($p=0,0001$), CT vs DRTLla ($p<0,0001$), DRT vs CTLa ($p=0,0084$) e DRT vs DRTLla ($p=0,0006$) (Tabela 4).

Sóleo: A análise do sóleo houve diferença estatística entre os grupos: C vs CT ($p<0,0001$), DR vs CT ($p<0,0001$), DR vs DRT ($p=0,0013$), CT vs CTLa ($p<0,0001$), CT vs DRTLla ($p<0,0001$) e DRT vs DRTLla ($p=0,0474$) (Tabela 4).

Tibial Anterior: A análise do tibial anterior houve diferença estatística entre os grupos: C vs CT ($p<0,0001$), C vs DRT ($p=0,0252$), DR vs CT ($p<0,0001$), DR vs DRT ($p=0,0025$), CT vs CTLa ($p<0,0001$), CT vs DRTLla ($p<0,0001$), DRT vs CTLa ($p=0,0018$) e DRT vs DRTLla ($p=0,0002$) (Tabela 4).

Diafragma: A análise do diafragma houve diferença estatística entre os grupos: DR vs CT ($p=0,253$), CT vs CTLa ($p=0,0006$), CT vs DRTLla ($p=0,0002$), DRT vs CTLa ($p=0,0054$) e DRT vs DRTLla ($p=0,0025$) (Tabela 4).

Durante a análise do glicogênio hepático, ficou evidente que houve diminuição da reserva no DR45 vs C45 ($p<0,0001$), no entanto, depois de ocorrer a recuperação nutricional os valores de glicogênio hepático ficaram mantidos entre os grupos C90 e DR90 ($p>0,05$). Ao final do programa de treinamento físico foi feita uma nova análise, a qual mostrou que os grupos DRT e DRTLla tiveram maiores reservas se comparado aos grupos CT e CTLa, 126,6% ($p=0,01$) e 93,07% ($p=0,0119$) respectivamente (Tabela 4).

DISCUSSÃO

No que diz respeito a evolução da massa corporal, os resultados demonstraram que o modelo de desnutrição proteica, quando aplicado nos estágios iniciais e críticos do desenvolvimento, neste caso, foi nos primeiros 45 dias do experimento, apresentou potencial para modular o desenvolvimento do peso, visto que os animais tiveram menores valores. Tais resultados são decorrentes da baixa disponibilidade de aminoácidos (REIS et al., 1997), confirmando o potencial da referida dieta para indução do quadro de desnutrição proteica nos grupos DR, DRT e DRTLla, ainda, pela diferença ser maior de 40% da massa corporal, essa diminuição caracteriza uma desnutrição de terceiro grau em humanos (GUERI; GURNEY; JUTSUM, 1980). Os resultados do presente estudo, no que diz respeito a evolução da massa, corroboram com os achados de diversos estudos (PEZOLATO et al., 2015; JERONIMO et al., 2016; PERTILLE et al., 2016; LOPES et al., 2017), demonstrando

a importância da ingestão de proteínas para a ótima evolução da massa corporal nos estágios iniciais e críticos do desenvolvimento.

Na etapa seguinte, ao se iniciar a recuperação proteica, foi visto que houve evolução parcial da massa corporal, visto que aos animais chegara no final da fase adulta, ainda sim houve diferença estatística entre todos os grupos que passaram pela desnutrição proteica, em relação aos grupos que fizeram uma dieta normoproteica, confirmando o potencial da referida dieta para indução do quadro de desnutrição proteica e alterações estruturais associadas, possivelmente de maneira permanente (REIS et al., 1997; LATORRACA et al., 1998).

Interessantemente, o grupo CTRLa teve menor massa corporal quando comparado aos grupos C e CT, demonstrando que a PBM associado ao exercício pode diminuir a gordura corporal, uma vez que os fótons do laser vermelho e infravermelho podem ser absorvidos pela citocromo C oxidase, levando um aumento do potencial da membrana mitocondrial, aumentando o consumo de oxigênio, de trifosfato de adenosina (ATP), aumento transitório de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberando óxido nítrico (NO) (NEIRA et al., 2002; AVCI et al., 2013). Isto acontece na mitocôndria da célula adiposa, como resposta a estes fatores, ocorre o aumento os níveis de monofosfato de adenosina cíclica (AMPC), a qual ativa a proteína quinase (PKA), fosforilando a Lipase hormônio sensível (LH), enzima que irá converter o triglicerídeo em glicerol e ácidos graxos, os quais podem ser usados na betaoxidação (NEIRA et al., 2002; AVCI et al., 2013; JANKOWSKI et al., 2017).

O MFEL é um dos melhores testes para marcar a capacidade de resistência aeróbica (SVEDAHL; MACINTOSH, 2003). A importância do MSL é para definir a intensidade do exercício, uma vez que se houver acúmulo de lactato, a glicólise pode exceder a demanda de utilização do piruvato na respiração mitocondrial, por esse motivo, podemos definir se o exercício físico está utilizando fontes energéticas aeróbicas ou anaeróbicas (FERREIRA et al., 2007). O teste foi utilizado para averiguar qual seria a intensidade para montar o programa de treinamento periodizado linear, como visto na Figura-3A, assim, por não haver diferença estatística e o valores estarem abaixo de 4mmol/ml (DE BARROS MANCHADO et al., 2006), o exercício foi caracterizado como aeróbico e a intensidade alcançada foi de 24m.min, tanto para o grupo que passou por dieta normoproteica, quanto para o grupo que passou por desnutrição e recuperação nutricional. Assim, o estudo é pioneiro em definir a MFEL em animais desnutridos e recuperados.

Nossa pesquisa colabora com Pezolato et al. (2015), visto que os níveis de hematócritos foram significativamente baixo no grupo DR45 em relação ao C45, demonstrando que a falta de aminoácidos pode gerar uma deficiência no perfil sanguíneo, o qual foi recuperado, quando os animais fizeram uma dieta normoproteica. Ainda, o exercício aeróbico pode alterar o nível dessas células, cuja concentração está correlacionada com o desempenho físico em exercícios de longa duração, sendo que seu aumento é influenciado pela redução do volume do plasma (CONVERTINO, 1991; SANTHIAGO et al., 2009). Nosso desenho de treino periodizado, não ocorreu sua diminuição, visto em outros programas de treino aeróbico (SANTHIAGO et al., 2009), ainda a PBM não mostrou aumentar os níveis de hematócritos, assim essa não é a via que justificaria o aumento da performance física no teste de exaustão ao se comparar o grupo DRT com o DRTL_a, e o grupo CT com o CTL_a.

O aumento da performance física aeróbica dos grupos irradiados corrobora com diversas pesquisas (LEAL JUNIOR et al., 2009; DE MARCHI et al., 2012; FERRARESI; HAMBLIN; PARIZOTTO, 2012; FERRARESI et al., 2015; SILVA et al., 2015; GUARALDO et al., 2016), porém essa é pioneira em averiguar os efeitos da PBM em ratos desnutridos e recuperados nutricionalmente, visto que esta informação é importante, uma vez que grande parte dos corredores são de países que possuem um altíssimo nível de desnutrição infantil (SIMIYU NJORORAI, 2010). Desta maneira, o perfil metabólico oxidativo do grupo DRTL_a não teve prejuízos que afetem sua performance, uma vez que não houve diferença em relação ao grupo CTL_a, tanto no teste de exaustão, quanto no nível de lactato sérico.

O glicogênio do miocárdio parece sofrer com os efeitos da desnutrição proteica, no entanto é um tecido de possível recuperação, pois seus níveis voltaram ao normal, após a recuperação nutricional, como já visto em análises eletrocardiográficas e no tecido sanguíneo (PEZOLATO et al., 2013a, 2015). Ainda, esse órgão mantém o nível de glicogênio, por mais que tenha grupos que fizeram atividade física aeróbica, sendo irradiado ou não.

Por mais que o exercício aeróbico aumente a expressão de AKT, a fosforilação da AKT e fosforilação da glicogênio sintetase quinase-3 β no miocárdio (ZHANG et al., 2007), essas reservas não ficam elevadas, pois o uso contínuo do músculo, ainda mais durante a atividade física aeróbica, deve nivelar as reservas de glicogênio, demonstrando que esse é um tecido extremamente versátil.

Sobre o glicogênio muscular, é visto que a desnutrição proteica deixa essa concentração baixa, a qual foi recuperada, menos nos músculos diafragma, gastrocnêmio branco e sóleo. A diminuição de glicogênio muscular no diafragma é visto quando se há privação de nutrientes (LEWIS et al., 1986), agora, as fibras brancas do gastrocnêmio, apresentam menores reservas, possivelmente, pois a desnutrição auxilia na criação de fundo metabólico oxidativo, sendo que o primeiro tecido muscular a sofrer o catabolismo na desnutrição são as fibras glicolíticas (LO; RUSSELL; TAYLOR, 1970b; JEEJEEBHOY, 2012).

Nossos resultados do aumento da performance dos grupos irradiados (CTLa e DRTL_a), provam ser reais, uma vez que os níveis de glicogênio muscular, tanto do gastrocnêmio vermelho, quanto no sóleo, músculos predominantemente vermelhos, são superiores ao se comparar com os grupos CT e DRT, assim permitindo ter melhora da resistência a fadiga, mostrando que o laser de baixa intensidade pode atuar de maneira direta na sinalização de insulina, possivelmente, aumentando as enzimas fosforiladoras de glicogênio, cujo foi uma limitação da presente pesquisa não dosar.

Ainda, todos os grupos CT e DRT, tiveram menores concentrações de glicogênio muscular GB, GV e Sóleo, em relação aos grupos C e DR, por mais que o exercício aeróbico aumente a expressão de AKT, a fosforilação de AKT e a fosforilação do glicogênio sintetase quinase-3 β (ZHANG et al., 2007), assim justificamos o resultado pelo pouco tempo de repouso, 3 dias, que os animais tiveram após realizarem o teste de exaustão, não recuperando o glicogênio completamente, mais uma vez enaltecendo a importância do laser no exercício físico aeróbico, demonstrando melhora da recuperação do glicogênio muscular, já que não houve diferença estatística entre os grupos DRTL_a, CTL_a com os grupos C e DR.

CONCLUSÃO

É possível que os efeitos deletérios causados pela desnutrição proteica não afetem a performance física durante um exercício aeróbico, visto que ao passar pela recuperação nutricional, grande parte das características analisadas foram normalizadas, principalmente pelo aumento do glicogênio dos músculos vermelhos e do fígado, podendo ser essa uma condição adaptativa, a qual justifique o mesmo desempenho. Ainda, a PBM é capaz de aumentar as reservas de glicogênio muscular, possibilitando um aumento da resistência a fadiga, promovendo melhora nos

resultados esportivos, uma vez que foi traçada a máxima fase estável de lactato de animais que passam por uma dieta normoproteica, quanto em animais que passam por uma desnutrição e recuperação nutricional, a qual pode ser utilizada para estudos futuros, auxiliando a delinear estratégias de treinamento periodizados.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AVCI, P. et al. Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review. **Lasers in surgery and medicine**, v. 45, n. 6, p. 349–57, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749426>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

BANFI, G.; DOLCI, A. Preanalytical phase of sport biochemistry and haematology. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 43, n. 2, p. 223–30, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853905>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

BOURKE, C. D.; BERKLEY, J. A.; PRENDERGAST, A. J. Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. **Trends in immunology**, v. 37, n. 6, p. 386–398, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27237815>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

BRITO VIEIRA, W. H. et al. Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 74, n. 2, p. 444–9, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166329>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

CALDERS, P. et al. Effect of branched-chain amino acids (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 4, p. 583–7, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211856>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

CONVERTINO, V. A. Blood volume: its adaptation to endurance training. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 23, n. 12, p. 1338–48, dez. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1798375>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

BARROS MANCHADO, F. et al. **The maximal lactate steady state is ergometer-dependent in experimental model using rats** *Rev Bras Med Esporte*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/20677/S1517-86922006000500007.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

BRITO VIEIRA, W. H. et al. 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 in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 497–504, 26 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21870127>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

MARCHI, T. et al. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 231–236, 8 jan. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10103-011-0955-5>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

DEUTZ, N. E. P. et al. Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 929–936, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814383>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

FERRARESI, C. et al. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 9, p. 740–754, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378263>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

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 in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 267–286, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/plm.2012.1.issue-4/plm-2012-0032/plm-2012-0032.xml>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

FERREIRA, J. C. et al. MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING MICE: EFFECT OF EXERCISE TRAINING. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, ago. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

GUARALDO, S. A. et al. The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 833–840, 9 jul. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10103-016-1882-2>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

GUERI, M.; GURNEY, J. M.; JUTSUM, P. The Gomez classification. Time for a change? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 5, p. 773–7, 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6975186>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

JANKOWSKI, M. et al. Low-level laser therapy (LLLT) does not reduce subcutaneous adipose tissue by local adipocyte injury but rather by modulation of systemic lipid metabolism. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 2, p. 475–479, fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384041>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

JEEJEEBHOY, K. N. Malnutrition, fatigue, frailty, vulnerability, sarcopenia and cachexia. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 15, n. 3, p. 213–219, maio 2012. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00075197-201205000-00004>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

JERONIMO, L. C. et al. Morphological and Morphometric Study of the Muscle Fibers and Neuromuscular Junctions of the Extensor Digitorum Longus in Aged Rats Submitted to Maternal Protein Restriction. **International Journal of Morphology**, v. 34, n. 1, p. 396–403, mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022016000100057&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 8 dez. 2018.

LATORRACA, M. Q. et al. Protein Deficiency and Nutritional Recovery Modulate Insulin Secretion and the Early Steps of Insulin Action in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 10, p. 1643–1649, 1 out. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9772130>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

LEAL JUNIOR, E. C. P. et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 6, p. 857–863, 5 nov. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10103-008-0633-4>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

LEWIS, M. I. et al. Effect of nutritional deprivation on diaphragm contractility and muscle fiber size. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 60, n. 2, p. 596–603, fev. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3949661>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

LO, S.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 28, n. 2, p. 234–236, fev. 1970a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5413312>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

LO, S.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of applied physiology**, v. 28, n. 2, p. 234–6, fev. 1970b. Disponível

em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5413312>>. Acesso em: 8 jul. 2014.

LOCHS, H. et al. Introductory to the ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Terminology, Definitions and General Topics. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 180–186, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697086>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

LOPES, T. de S. et al. Protein Malnutrition Pre- and Postnatal and Nutritional Rehabilitation Modulates the Morphology of Muscle Fibers in Wistar Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, n. 3, p. 278–287, 4 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558017>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

NEIRA, R. et al. Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 110, n. 3, p. 912–22; discussion 923-5, 1 set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12172159>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

OLIVEIRA, E. C. de et al. Treino físico promove aumento de peso em ratos desnutridos sem causar stress oxidativo. **Motricidade**, v. 11, n. 2, p. 25–35, 28 jun. 2015. Disponível em: <<http://revistas.rcaap.pt/motricidade/article/view/3175>>. Acesso em: 9 jan. 2019.

WHO. Levels & Trends in Child Mortality. **World Health Organization**, 2018. Disponível em: <<https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2018/09/UN-IGME-Child-Mortality-Report-2018.pdf>>.

PERTILLE, A. et al. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 83–91, 4 jul. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842017000100083&lng=en&tln=en>. Acesso em: 8 dez. 2018.

PEZOLATO, V. A. et al. Electrocardiographic profile of rats after malnutritional recovery. **Medicina (Brazil)**, v. 46, n. 3, 2013.

PEZOLATO, V. A. et al. PERFIL HEMATOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS A DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL. **BIOMOTRIZ**, v. 9, n. 2, 13 dez. 2015. Disponível em: <<http://revistaeletronica.unicruz.edu.br/index.php/BIOMOTRIZ/article/view/1996>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

PIMENTEL, G. D. et al. The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. **Metabolism**, v. 62, n. 2, p. 171–

178, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898253>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

REIS, M. A. B. et al. Glucose-Induced Insulin Secretion Is Impaired and Insulin-Induced Phosphorylation of the Insulin Receptor and Insulin Receptor Substrate-1 Are Increased in Protein-Deficient Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 3, p. 403–410, 1 mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082023>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

RODRIGUES, L. D. et al. **Manual de Cuidados e Procedimento com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. 1. ed. [s.l: s.n.]

RYTTER, M. J. H. et al. Social, dietary and clinical correlates of oedema in children with severe acute malnutrition: a cross-sectional study. **BMC Pediatrics**, v. 15, n. 1, p. 25, 22 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25885808>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

SANTHIAGO, V. et al. Responses of Hematological Parameters and Aerobic Performance of Elite Men and Women Swimmers During a 14-Week Training Program. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 23, n. 4, p. 1097–1105, jul. 2009. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00124278-200907000-00007>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

SILVA, A. A. de O. et al. Pre-exercise low-level laser therapy improves performance and levels of oxidative stress markers in mdx mice subjected to muscle fatigue by high-intensity exercise. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 6, p. 1719–1727, 16 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26076829>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

SIMIYU NJORORAI, W. W. Global inequality and athlete labour migration from Kenya. **Leisure/Loisir**, v. 34, n. 4, p. 443–461, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14927713.2010.543502>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 246–264, 12 set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504762>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

SIU, P. M. et al. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 2,

p. 555–560, fev. 2003. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531911>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee**, v. 28, n. 2, p. 299–323, abr. 2003. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12825337>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

ZHANG, K.-R. et al. Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. **Apoptosis**, v. 12, n. 9, p. 1579–1588, 25 jul. 2007. Disponível em:
<<http://link.springer.com/10.1007/s10495-007-0090-8>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

3. Estudo II

**Efeitos da fotobiomodulação na lesão muscular, associado ao treino aeróbico
periodizado em animais desnutridos e recuperados nutricionalmente**

Submetido: Journal of Photochemistry & Photobiology:B, em 21 de Janeiro de

2019, sob referência JPHOTOBIOL_2019_85

Efeitos da fotobiomodulação na lesão muscular, associado ao treino aeróbico periodizado em animais desnutridos e recuperados nutricionalmente.

Vitor Alexandre Pezolato¹, Rodrigo Dias², Ana Laura Martins de Andrade¹, Carlos Alberto da Silva³, Nivaldo Antonio Parizotto⁴

1. Doutorando de Fisioterapia pela Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, SP.
2. Professor Titular da Educação Física da Associação de Ensino Superior do Piauí, AESPI, PI.
3. Professor Titular de Fisioterapia pela Universidade Paulista - UNIP, SP.
4. Professor Titular da Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, SP.

ENDEREÇO:

Universidade Metodista de Piracicaba – Rodovia do Açúcar, km156 (SP-308)

CEP: 13,423-170 – Piracicaba, SP – Brasil

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – Rodovia Washington Luis, Km 235 (SP-310)

CEP: 13,565-905 – São Carlos, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Vitor Alexandre Pezolato

Vitor.pezolato@gmail.com

RESUMO

A desnutrição proteica pode ocorrer devido a falta dos macros nutrientes como proteínas, carboidratos e/ou lipídeos e/ou micronutrientes. A carência destes nutrientes pode ocasionar deficiência da massa e estatura corporal bem como retardo no desenvolvimento neuropsicomotor. Recentes estudos têm buscado observar as consequências da desnutrição e da recuperação proteica no organismo de indivíduos com lesões musculares, destacando que a prática de exercícios físicos associados a recursos terapêuticos como a fotobiomodulação (PBM) são capazes de acelerar a recuperação destes indivíduos. Assim esse estudo teve como objetivo averiguar quais as consequências da desnutrição seguida da recuperação proteica em animais com lesões musculares, além de observar a ação do exercício físico associado, ou não, a PBM nesses animais. Setenta e dois ratos *Wistar* foram utilizados, sendo divididos em oito grupos, controle (C), controle treinado (CT), controle treinado e lesado (CTL), controle treinado lesado e irradiado (CTLLa), desnutrido recuperado (DR), desnutrido recuperado treinado (DRT), desnutrido recuperado e lesado (DRTL), desnutrido recuperado treinado lesado e irradiado (DRTLLa). Foi realizada a lesão muscular através da técnica de criolesão no ventre do musculo tibial anterior. Foi utilizada esteira ergométrica para os grupos treinados e um laser infravermelho (780nm) para os grupos irradiados. Foram realizadas as análises de ensaio mecânico de tração e determinação do conteúdo glicogênio, creatinina, globulinas, albumina e proteínas totais. Os resultados do teste de tração demonstraram que os animais recuperados, treinados e tratados com a PBM apresentaram resultados positivos, porém os animais desnutridos apresentavam menor resistência que os demais e com relação a concentração de glicoproteínas os animais irradiados apresentaram melhores resultados. Assim podemos concluir que a desnutrição afeta de forma direta a resistência muscular, mas com o auxílio da PBM e do exercício físico pode-se obter uma melhora significativa.

Palavras-chave: lesão muscular, desnutrição, fotobiomodulação

ABSTRACT

Protein malnutrition may occur due to lack of macro-nutrients such as proteins, carbohydrates, lipids and micro-nutrients. The deficiency of these nutrients can cause deficiency of body mass and stature as well as retardation in the neuro-psycho-motor development. Recent studies have sought to observe the consequences of malnutrition and protein recovery in the body of individuals with muscular injuries, emphasizing that the practice of physical exercises associated with therapeutic resources such as photobiomodulation (PBM) are able to accelerate the recovery of these individuals. Thus, this study aimed to investigate the consequences of malnutrition followed by protein recovery in animals with muscle injuries, in addition to observing the action of physical exercise associated or not with PBM in these animals. Seventy-two Wistar rats were used, divided into eight groups, control (C), trained control (CT), trained and injured control (CTL), trained and irradiated trained control (CTLLa), recovered malnutrition (DR), recovered trained malnutrition (DRT), recovered and injured malnourished (DRTL_a), recovered malnourished trained injured and irradiated (DRTLL_a). Muscle injury was performed through the cryosurgery technique in the belly of the anterior tibial muscle. Exercise treadmill was used for the trained groups and an infrared laser (780nm) for the irradiated groups. Mechanical tensile tests and determination of glycogen content, creatinine, globulins, albumin and total proteins were performed. The results of the traction test showed that the animals recovered, trained and treated with the PBM showed positive results, but the malnourished animals showed less resistance than the others and in relation to the concentration of glycoproteins the irradiated animals showed better results. Thus, we can conclude that malnutrition directly affects muscular endurance, but with the aid of PBM and physical exercise a significant improvement can be obtained.

Keywords: muscle injury; malnutrition; photobiomodulation.

INTRODUÇÃO

Comer é algo essencial para vida humana, uma vez que esse ato é capaz de suprir nossas necessidades metabólicas diárias, sendo que um hábito errado alimentar é um problema de saúde pública, podendo gerar grandes deficiências (BLÖSSNER et al., 2005).

Assim a desnutrição proteica é um problema comum nos países em desenvolvimento, podendo levar a um retardo no crescimento infantil, gerando alterações metabólicas severas nessas crianças, as quais podem estar associadas na redução de liberação de insulina e perturbação da homeostase da glicose, característica essas que comprometem o desenvolvimento muscular frente ao exercício físico (GALDINO et al., 2000).

O exercício físico irá se beneficiar com o correto funcionamento metabólico, mesmo quando um indivíduo para pela desnutrição proteica e se recupera nutricionalmente, mas há poucas informações sobre como o exercício físico pode afetar o organismo desses sujeitos.

Obviamente, toda atividade física pode gerar lesões musculotendineas, ainda, pouco se sabe sobre como o organismo que passou por uma desnutrição proteica nas principais fases do desenvolvimento corporal se ajusta para se recuperar de lesões musculares, visto que estudos mostram alterações na cinética de lactato frente ao esforço agudo(VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2007), bem como, mudanças na resposta da insulina, albumina e oxidação de glicose diminuída no músculo sóleo, assim como a concentração de glicogênio(PRADA; MACEDO; MELLO, 2007; OLIVEIRA et al., 2015).

Lesões musculares são consequências comuns nas áreas esportivas e laborais, sendo que sua severidade pode afetar a função muscular ocasionando comprometimento esportivo, podendo acarretar em contraturas, quadros dolorosos levando a atrofia muscular e aumentando a chance de uma re-lesão(FILIPPIN et al., 2011; RENNÓ et al., 2011). Estudos recentes tem demonstrado que a fotobiomodulação (PBM) apresenta resultados positivos no tratamento de reparo muscular, devido ao aumento da atividade do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator de regulação miogênica (MyoD), ainda, diminuindo a concentração de colágeno tipo I, evitando fibrose(ASSIS et al., 2013)., A PBM ainda é capaz de gerar a diminuição de marcadores de dano muscular creatina quinase (CK), do

Lactato desidrogenase (LDH), do aumento de estimulação mitocondrial, principalmente da citocromo C Oxidase, melhorando os índices de fadiga muscular e desempenho físico, principalmente, aeróbico (FERRARESI; HAMBLIN; PARIZOTTO, 2012).

Desta maneira, a condição da recuperação de lesão muscular em situações de desnutrição proteica com subsequente, recuperação nutricional, durante a prática de atividade física aeróbica de longa duração, ainda é desconhecida, abrindo novas perspectivas de investigação sobre o comportamento mecânico e metabólico, associado ou não com estratégias de tratamento através de agentes bioeletrofísicos.

Assim, esse estudo teve como objetivo averiguar se a desnutrição proteica, seguida de recuperação nutricional pode deixar sequelas, as quais comprometam a recuperação após uma lesão muscular ou diminuam a resistência muscular a tração podendo facilitar uma re-lesão, ainda, mensurando se a FBM é capaz de alterar o comportamento energético muscular, auxiliando para uma reabilitação precoce.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizados 84 ratos da linhagem *Wistar* (*Rathus norvegicus* var, *albinus*, *Rodentia*, *Mamalia*), desmamados no 21º dia de vida, provenientes da empresa *Anilab*® (Paulínia-SP). Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas coletivas contendo 5 e 7 animais, as quais tinham ambiente enriquecido que visa implementar interesses contínuos evitando a monotonia, para isso é realizado a colocação de brinquedos como: bolas e tubos, semanalmente. Ainda, proporcionar maior possibilidade de interações naturais da espécie no que diz respeito às questões ambientais e sociais (RODRIGUES et al., 2013). Esse ambiente foi escolhido pois apresenta potencial para minimizar o nível de estresse e, conseqüentemente, aumento das possibilidades de obtenção de animais mais estáveis com relação aos parâmetros fisiológicos e psicológicos (SIMPSON; KELLY, 2011), assegurando melhores resultados científicos.

Ademais, os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 ± 2 °C e iluminação adequada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6:00 horas

Os animais foram tratados de acordo com as recomendações do *Guide for Care Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996), sendo o trabalho aprovado pela Comissão de Experimentação Animal da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) sob protocolo de número 04/16.

Grupos experimentais

Após o período de desmame dos animais, os mesmos foram aleatoriamente divididos em 12 grupos, contendo 7 animais em cada, assim denominados: Controle 45 dias (C45), Controle 90 dias (C90), Controle (C), Controle Treinado (CT), Controle Treinado e Lesado (CTL), Controle Treinado Lesado e Irradiado (CTLLa), Desnutrido 45 dias (DR45), Desnutrido Recuperado 90 dias (DR90), Desnutrido Recuperado (DR), Desnutrido Recuperado Treinado (DRT), Desnutrido Recuperado e Lesado (DRTL), Desnutrido Recuperado Treinado Lesado e Irradiado (DRTLLa). O grupo C e DR no dia 45 de experimento será titulado como C45 e DR45, respectivamente, no dia 90 de experimento, C90 e DR90, respectivamente. O período total de experimento foi de 129 dias, sendo que do dia 90 até o dia 126 houve o treinamento físico, e o último dia, as coletas.

Desenho Experimental

Inicialmente os grupos C45, C90, C, CT, CTL e CTLLa passaram pela dieta normoprotéica (AN 93 M 14%) e os grupos DR45, DR90, DR, DRT, DRTL e DRTLLa passaram por uma dieta hipoprotéica (AN 6%) por 45 dias, causando o estado de desnutrição proteica e foram recuperados com dieta normoprotéica durante 45 dias.

Os grupos C45 e DR45 passaram pelas coletas no dia 45 de experimento, sendo que os grupos C90 e DR90, passaram pelas coletas no dia 90 de experimento.

Ao atingirem o 83º dia de experimento, os grupos passaram por um protocolo de adaptação na esteira e, posteriormente, por um programa de treinamento físico, o qual se inicia no dia 90º e dura 36 dias, com exceção dos grupos C e DR.

Os grupos CTL, CTLLa, DRTL e DRTLLa sofreram a criolesão no 118º dia de experimento, ficando de repouso por 3 dias até voltarem ao programa de treinamento físico, sendo que os grupos CTLLa e DRTLLa receberam irradiação de laser de baixa intensidade após cada sessão de treinamento depois que sofreram a criolesão. Vide Figura 1 para melhor visualização do desenho experimental.

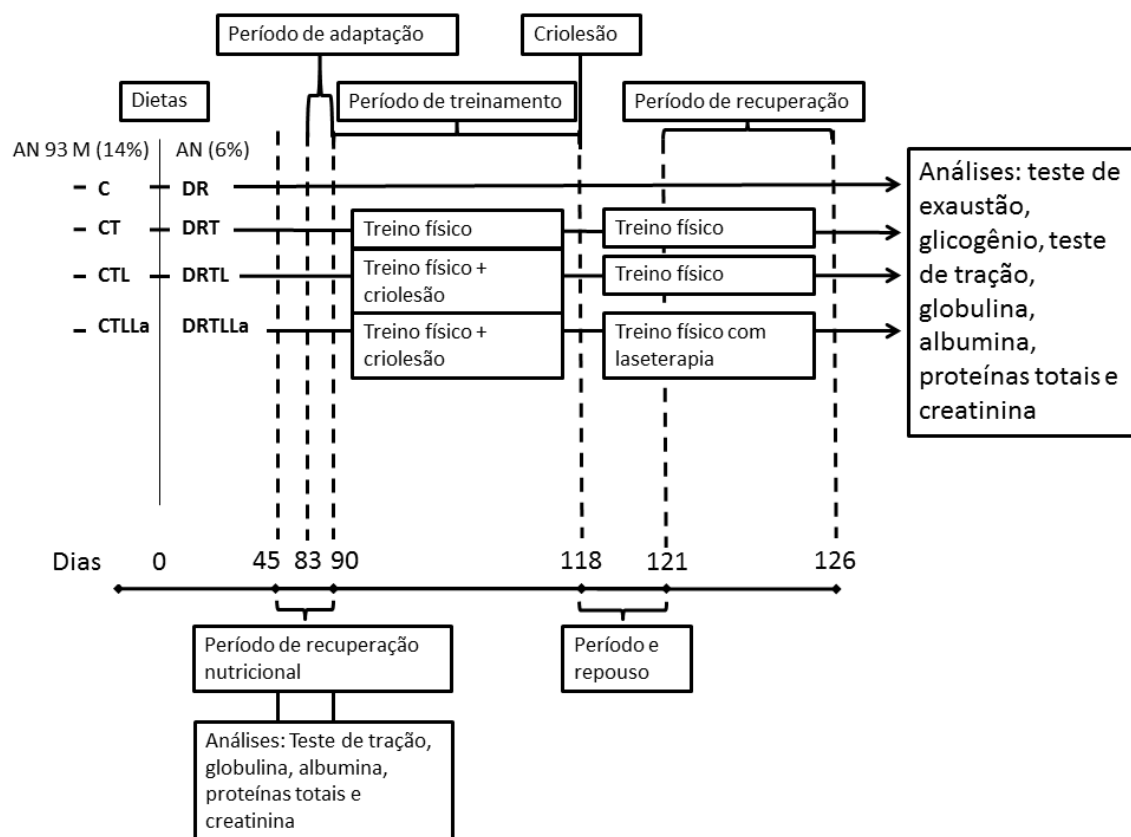


Figura 1 - Desenho experimental, seguindo uma linha temporal com as análises que foram realizadas em cada momento.

Protocolo de Desnutrição e Recuperação Nutricional

Os animais dos grupos C45, C90, C, CT e CTL e CTLLa foram alimentados com dieta normoproteica AIN 93 M, contendo 14% de proteína, enquanto os animais dos grupos DR45, DR90, DR, DRT, DRTL e DRTLLa foram alimentados com dieta hipoproteica AN contendo 6% de proteína por 45 dias, alimento comercializado pela PragSoluções Serviços e Comércio Ltda; CNPJ: 03.420.938/0001-59 / IE 401.091.476.112-ME. Posteriormente, os animais passaram pelo processo de recuperação nutricional, sendo alimentados com dieta normoproteica AIN 93 M, contendo 14% de proteína pelo período de 45 dias. As composições das referidas dietas estão previamente descritas (Tabela 1).

Tabela 5 - Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição recuperação nutricional.

Dieta AN 93 M -14%

Dieta AN - 6% proteína (desnutrição)

Ingredientes	p/1 Kg	Ingredientes	p/1 Kg
Amido de milho	465.700	Amido de milho	508.000
Caseína	140.000	Caseína	66.000
Amido dextrinizado	155.000	Amido dextrinizado	166.500
Sacarose	100.000	Sacarose	121.000
Óleo de soja	40.000	Óleo de soja	40.000
Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000	Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000
L-cistina	1.800	L-cistina	1.000
Cloreto colina	2.500	Cloreto colina	2.500
Mix mineral G	35.000	Mix mineral G	35.000
Mix vitamínico	10.000	Mix vitamínico	10.000
TOTAL	1000.0	TOTAL	1000.0

Esteira e Adaptação dos Animais

Para realizar os programas de treinamento físico, foi utilizada uma esteira ergométrica da marca Rebook TR2 Premierrun Treadmill® (Adidas do Brasil, Embú, SP, Brasil), apresentando 8 raias, com marcação de velocidade em metros por minuto (m/min) e inclinação automática. Os animais que receberam treinamento passaram pela adaptação na esteira na última semana de recuperação nutricional representando os dias 83 até o dia 90 de experimento. O protocolo de adaptação consistiu na colocação dos animais na esteira durante uma semana, sem inclinação, com aumento progressivo da velocidade até alcançar 18 m.min⁻¹ (valor médio da primeira semana de treinamento), com aumento progressivo do tempo de corrida até alcançar 15 minutos.

Programa de Treinamento Físico Periodizado com Polimento Linear

O protocolo de treinamento aeróbio foi realizado diariamente, de segunda-feira a sexta-feira, durante 36 dias, no período da tarde. Este protocolo apresenta periodização do volume e da intensidade obedecendo períodos de descanso ativo (Tabela 2).

Esta graduação tem o intuito de possibilitar uma adaptação dos animais ao treinamento, preconizando, assim, um predomínio do treinamento aeróbio. Sua

intensidade foi calculada seguindo os níveis de lactato encontrado nos referidos estudos (FERREIRA et al., 2007; BRITO VIEIRA et al., 2014).

Tabela 6 - Protocolo de treinamento, demonstrando a duração do treino em minutos, velocidade em metros por minuto ($m \cdot min^{-1}$) e a carga de treino.

Dia	Volume (min)	Intensidade ($m \cdot min^{-1}$)	Carga de treino (Volume x intensidade) = u.a.)
1	20	16	320
2	30	17	510
3	40	18	720
4	45	19	855
5	50	20	1000
6	0	-	-
7	0	-	-
8	60	20	1200
9	60	20	1200
10	60	20	1200
11	60	20	1200
12	60	22	1320
13	0	-	-
14	0	-	-
15	60	22	1320
16	60	24	1440
17	60	22	1320
18	60	24	1440
19	60	22	1320
20	0	-	-
21	0	-	-
22	60	24	1440
23	60	24	1440
24	60	24	1440
25	60	24	1440

26	60	24	1440
27	0	-	-
28	0	-	-
29	0	-	-
30	50	24	1200
31	40	24	960
32	35	24	840
33	30	24	720
34	25	24	600
35	0	-	-
36	0	-	-

O início do treinamento foi realizado com carga de trabalho menor (10% de velocidade e tempo predeterminados para o dia) como forma de aquecimento, conforme previamente preconizado (SIU et al., 2003).

Fotobiomodulação

Foi utilizado o laser de baixa intensidade GaAlAs (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil), sendo este calibrado e aferido antes do procedimento experimental, seguindo os parâmetros já publicados (BRITO VIEIRA et al., 2012) (Tabela 3).

As irradiações foram realizadas de modo pontual, no ventre muscular do tibial anterior e tríceps sural imediatamente após as sessões do exercícios físicos, visando aproveitar as condições de “estresse físico” e, conseqüentemente, de alterações metabólicas do animal, tendo em vista maior eficácia do laser nessas condições (FERRARESI et al., 2015).

Todos os animais foram tricotomizados na região em que receberam as irradiações, e durante a aplicação, foi utilizada uma manta de algodão para conter o animal.

Tabela 7 – Parâmetros de aplicação do laser de baixa intensidade GaAlAs

Parâmetros	Valores
------------	---------

Potência (mW)	70
Comprimento de Onda (nm)	780
Mode de Aplicação	Contínuo
Área transversa de saída do laser (cm ²)	0.04
Fluência (J/cm ²)	214
Tempo (s)	122
Energia (J)	8,54

Determinação do Peso

Semanalmente, os animais foram pesados através da balança digital (Indústria Filizola, São Paulo, SP, Brasil).

Determinação do Desempenho Físico

Para a determinação do desempenho físico, os animais passaram por um teste de exaustão, que se constitui em observar o máximo tempo que o animal consegue passar correndo, assim os animais realizaram exercício físico na esteira ergométrica na intensidade de 20 m/min⁻¹, sendo que a exaustão foi definida como ponto em que os animais estavam incapazes de continuar a passada contínua durante 1 minuto (CALDERS et al., 1999), tinha apenas um animal por raia.

Técnica cirúrgica e protocolo de criolesão

Os animais foram anestesiados de acordo com o peso corporal com injeção intraperitoneal de solução composta de Cloridrato de Ketamina (0,05mg/Kg) e Cloridrato de Xilasina (0,03 mg/Kg). Em seguida, a pele que recobre o músculo foi tricotomizada e higienizada para que fosse realizada uma incisão longitudinal de, aproximadamente, 1,5cm na região correspondente ao ventre do músculo tibial anterior.

Na literatura encontram-se o estudo de Miyabara et al. (2006) que utilizou a criolesão (lesão tecidual induzida por resfriamento) para realizar a lesão muscular. Assim, foi escolhido esse protocolo, pois é facilmente reprodutivo e gera uma lesão homogênea (não difusa) comparado a outras técnicas por cargas mecânicas, como lesão por estiramento através de exercício concêntrico (MALAGUTI et al., 2009) e excêntrico (LIMA-CABELLO et al., 2010).

A criolesão foi realizada na região do ventre do músculo tibial anterior. Para isso, um bastão de ferro com ponta de 0,5cm² foi previamente imerso em nitrogênio

líquido por 10 segundos, posteriormente pressionado perpendicularmente contra o ventre muscular por 30 segundos. Após um novo resfriamento do bastão por 10 segundos, esse procedimento foi repetido e, ao final, a pele foi suturada (Fio de Nylon 3-0 SHALON Ltda.) e limpa com álcool iodado.

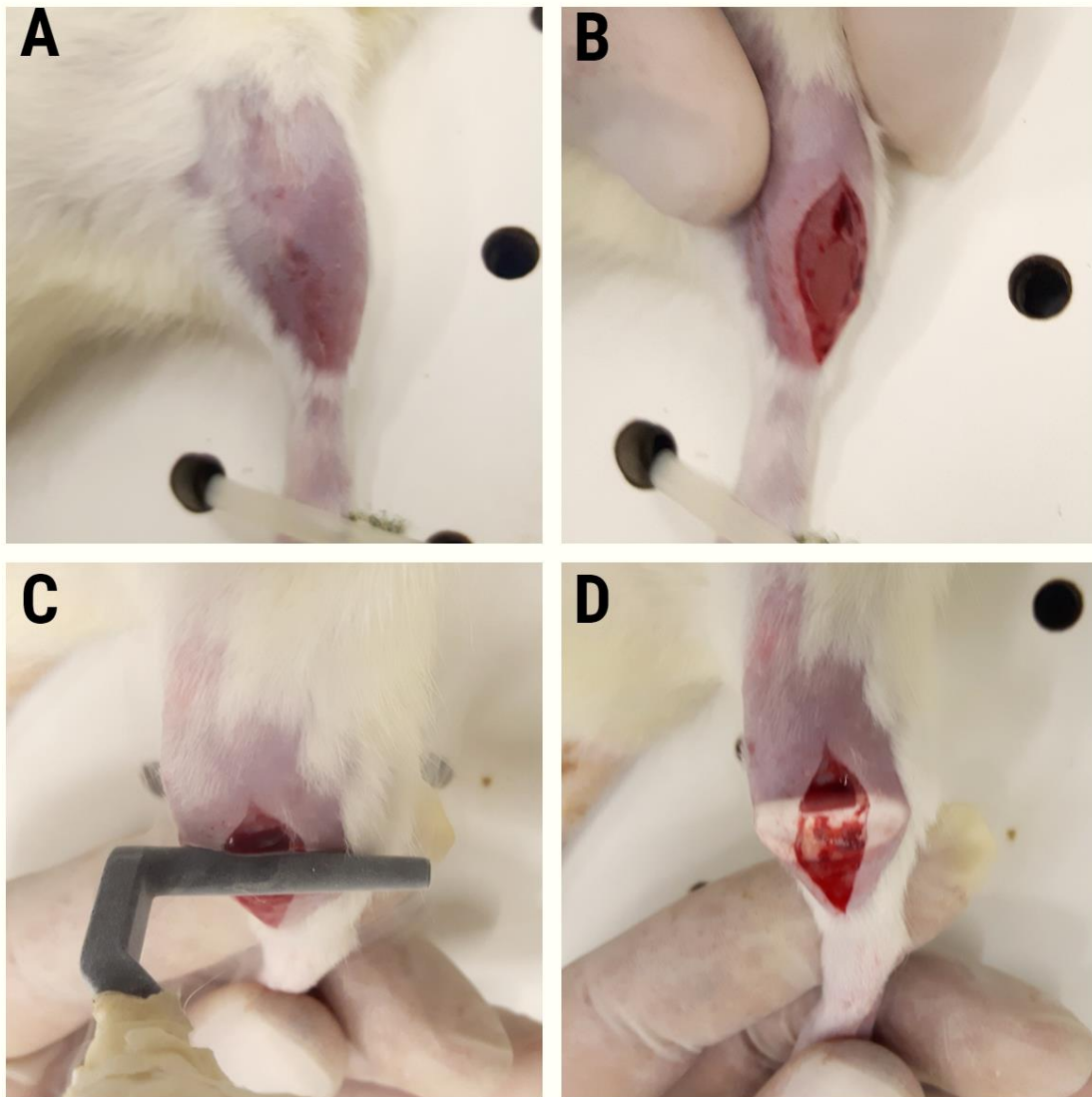


Figura 2 - A: Tricotomização da região, a qual foi realizada a criolesão. B: Processo de exposição do ventre muscular do tibial anterior. C: Colocação da haste, a qual passou pelo nitrogênio líquido, sobre o ventre muscular. D: Final do processo da criolesão.

Período de repouso pós-cirúrgico

Devido à dor e ao incômodo da lesão nas primeiras horas pós-cirúrgicas, os animais ficaram impedidos de realizar os exercícios físico. Dessa maneira, permaneceram em repouso em suas gaiolas com tratamento medicamentoso com 8 gotas de Metamizol (Dipirona[®]) (Germed Pharma, Campinas, SP, Brasil) dissolvidas em 500ml de água, por um período de 3 dias pós-cirúrgicos.

Ensaio Mecânico de Tração

Ocorreu a desarticulação da coxofemoral dos ratos, sendo que os músculos da perna foram completamente extraídos com exceção do tibial anterior e, em outra perna, os músculos sóleo e gastrocnêmio, formando o tríceps sural. Os ossos da perna (tíbia e fíbula) foram seccionados 5 milímetros acima da articulação do tornozelo e 5 milímetros abaixo da origem do músculo. As características mecânicas dos músculos foram analisadas na máquina universal de ensaios DL 2000 (EMIC, São Paulo, SP, Brasil), pertencente ao Laboratório de Materiais de Construção Mecânica da Faculdade de Engenharia, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), *campus* de Santa Bárbara d'Oeste. Para a realização do ensaio, foi usado um dispositivo para a fixação do fêmur à pinça móvel e do pé à pinça fixa da máquina, mantendo o músculo posicionado longitudinalmente a força de tração aplicada. Todas as amostras foram pré-tensionadas com 0,15N e a velocidade estabelecida para o ensaio foi de 5 milímetros por minuto, com as medidas realizadas a cada 0,5 milímetros (LIMA et al., 2007). A temperatura do laboratório de ensaios mecânicos foi controlada à $23\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Determinação do Conteúdo de Glicogênio

Para coleta das amostras, os ratos foram anestesiados com mistura de cloridrato de ketamina (Dopalen[®])(Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínea, SP, Brasil), e cloridrato de xilazina (Rompun[®]) (Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil), via intraperitoneal, considerando as orientações previamente publicadas de $0,1\text{mL}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e $0,07\text{mL}\cdot 100\text{g}^{-1}$, respectivamente (RODRIGUES et al., 2013). Sendo confirmado a inexistência de estímulos dolorosos, procedeu-se a decapitação e retirada dos tecidos, os quais foram congelados no biofreezer à -70°C .

Para determinação do conteúdo de glicogênio, após o descongelamento das amostras do músculo sóleo, gastrocnêmio (porção branca e vermelha) e tibial anterior, as mesmas foram submetidas à digestão em hidróxido de potássio (KOH) 30% e o glicogênio foi precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, com o glicogênio submetido à hidrólise ácida na presença de fenol,

considerando orientações previamente publicadas (LO; RUSSELL; TAYLOR, 1970a), sendo os resultados expressos em mg/100mg de tecido úmido.

Determinação da Concentração de Creatinina, Globulinas, Albumina e Proteínas Totais

Para a determinação da creatinina, globulinas, albumina e proteínas totais, procederam-se as técnicas de rotina de laboratórios de hematologia, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol/L}$, g/dL, g/dL e g/dL, respectivamente.

Análise Estatística

Os dados coletados foram tabulados e posteriormente analisados pelo *software* estatístico “GraphPad Prism 7”. A análise estatística foi procedida pela aplicação do teste Shapiro-Wilk para verificação da normalidade.

Os dados que se demonstraram paramétricos passaram pela análise de variância de uma via (one-way ANOVA), quando foi o caso, de duas vias (two-way ANOVA) seguido do teste de Tukey, enquanto as variáveis que se demonstrarem não paramétricas passaram pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de $p < 0,05$ para significância estatística.

RESULTADOS

Massa Corporal

Tabela 4 – Massa Corporal (g) dos animais nos diferentes períodos do experimento. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo C no dia 126 de experimento; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DR no dia 126 de experimento.

Dia	C	DR	CT	DRT	CTL	DRTL	CTLLa	DRTLLa
0	40,6 \pm 3,1	39,1 \pm 1,6	40,3 \pm 1,5	38,8 \pm 3,5	39,6 \pm 3,2	37,1 \pm 1,5	41,3 \pm 2,5	39,8 \pm 2,3
45	305,2 \pm 31,3	59,5 \pm 9,4	243 \pm 7,8	59,4 \pm 15,1	300,2 \pm 22,3	62,4 \pm 8,3	239,2 \pm 6,7	58,9 \pm 14,1
90	393 \pm 44,3	223,5 \pm 17,5	416,8 \pm 15,5	216,6 \pm 20,1	415,4 \pm 16,7	217,4 \pm 14,5	402,6 \pm 15,8	223,8 \pm 19,7
126	459,6 \pm 48,7	304,78 \pm 31,5*	421 \pm 2,7*#	282,6 \pm 34,8*	399 \pm 8,9*#	250,2 \pm 18,5*#	416,8 \pm 20*#	259,6 \pm 14,7*#

Os valores são expressos em média \pm desvio padrão

Analisando os dados da massa corporal, no momento inicial do experimento (dia 0), não houve diferença estatística ($p > 0,05$) ao se comparar os grupos, no entanto do dia 45 até o dia 126 de experimento, todos os grupos que realizaram a dieta

hipoproteica (DR, DRT, DRTL e DRTLLa), tiveram uma diminuição do peso corporal estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao se comparar com os grupos que se alimentaram, somente, da dieta normoproteica (C, CT, CTL, CTLLa), evidenciando que a desnutrição proteica afeta, definitivamente, a massa corporal mesmo após a recuperação proteica.

O grupo C, no dia 126 de experimento, se demonstrou com valores maiores de massa corporal em relação aos grupos CT, CTL, CTLLa ($p = 0,0487$, $p < 0,0001$, $p = 0,0181$, respectivamente), demonstrando que o exercício físico auxilia na diminuição do peso corporal (tabela 4).

O grupo DR, no dia 126 de experimento, apresenta ter valores maiores de massa corporal em relação aos grupos DRTL e DRTLLa ($p = 0,0007$ e $p = 0,0098$, respectivamente) (tabela 4).

Globulina, Albumina, Proteínas Totais e Creatinina

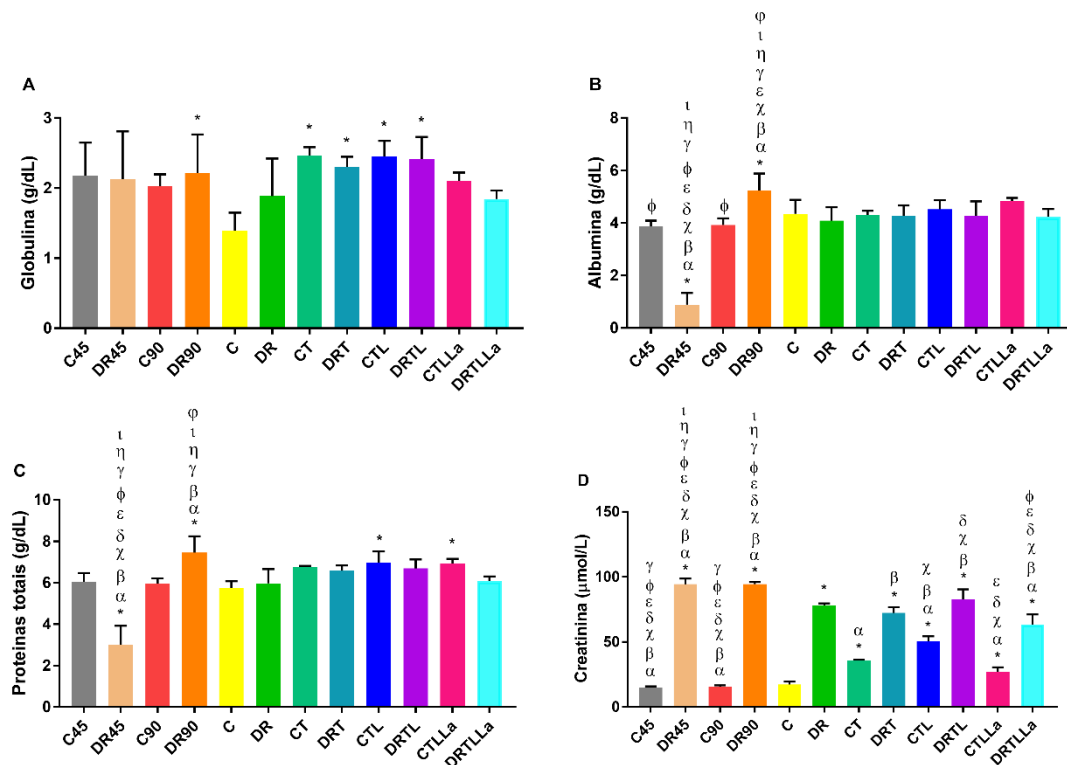


Figura 3 - A: Nível sérico de globulina. B: Nível sérico de albumina. C: Proteínas totais no sangue. D: Nível sérico de creatinina. * diferença estatística em relação ao grupo C, sendo $p < 0,05$; α diferença estatística em relação ao grupo DR, sendo $p < 0,05$; β diferença estatística em relação ao grupo CT, sendo $p < 0,05$; γ diferença estatística em relação ao grupo DRT, sendo $p < 0,05$; δ diferença estatística em relação ao grupo CTL, sendo $p < 0,05$; ϵ diferença estatística em relação ao grupo DRTL, sendo $p < 0,05$; ϕ diferença estatística em relação ao grupo CTLLa, sendo $p < 0,05$; γ diferença estatística em relação ao grupo DRTLLa, sendo $p < 0,05$; η diferença estatística em relação ao grupo C45, sendo

p<0,05; φ diferença estatística em relação ao grupo DR45, sendo p<0,05; ι diferença estatística em relação ao grupo C90, sendo p<0,05.

Em relação a concentração de globulina (figura 3-A), é visto que o grupo C teve menores concentrações ao se comparar com os grupos CT (p=0,038), DRT (p=0,0253), CTL (p=0,004), DRTL (p=0,006) e DR90 (p=0,042).

Já a concentração de albumina (figura 3-B) foi muito baixa no grupo DR45, mostrando que há diferença estatística (p<0,05) ao se comparar com todos os outros grupos. No entanto, o grupo DR90, obteve maiores concentrações de albumina (p<0,05) ao se comparar com os grupos C, DR, CT, DRT, DRTL, DRTLLa, C45 e C90. Já o grupo CTLLa obteve maiores concentrações de albumina em relação aos grupos C45 (p=0,026) e C90 (p=0,045).

Ao analisar a concentração de proteínas totais, o grupo DR45 obteve as menores quantidades ao se comparar com todos os outros grupos (p<0,05). Diferente do grupo DR90, o qual possuiu maiores concentrações (p<0,05) ao se comparar com os grupos C, DR, CT, DRTLLa, C45 e C90. Ainda, o grupo C, teve valores reduzidos de proteína total ao se comprar com os grupos CTL (p=0,026) e CTLLa (p=0,034).

Finalmente, é visto que o grupo C45, C90 e C, tem uma menor concentração de creatinina ao se comparar com os demais grupos. O oposto acontece com os níveis dos grupos DR45 e DR90, os quais possuem maiores concentrações (p<0,05) ao se compararem com os demais, não tendo diferença entre si (p>0,999).

Sobre a creatinina, o grupo DR apresentou níveis superiores de concentração em relação aos grupos CT (p<0,001), CTL (p<0,001), CTLLa (p<0,001) e DRTLLa (p<0,001). Já o grupo CT teve menor quantidade de creatinina quando se comparado aos grupos DRT (p<0,001), CTL (p<0,001), DRTL (p<0,001) e DRTLLa (p<0,001). O grupo DRT teve menores concentrações ao se comparar com o grupo DRTL (p=0,006) e maiores concentrações em relação aos grupos CTL (p<0,001), CTLLa (p<0,001) e DRTLLa (p=0,040).

Ainda, o grupo CTL teve menores concentrações em relação aos grupos DRTL (p<0,001) e DRTLLa (p=0,002) e maior concentração ao se comparar com o grupo CTLLa (p<0,001). Já o grupo DRTL teve sua concentração maior em relação aos grupos CTLLa (p<0,001) e DRTLLa (p<0,001), por fim, o grupo CTLLa teve uma menor concentração ao se comprar com o DRTLLa (p<0,001).

Teste de Tração

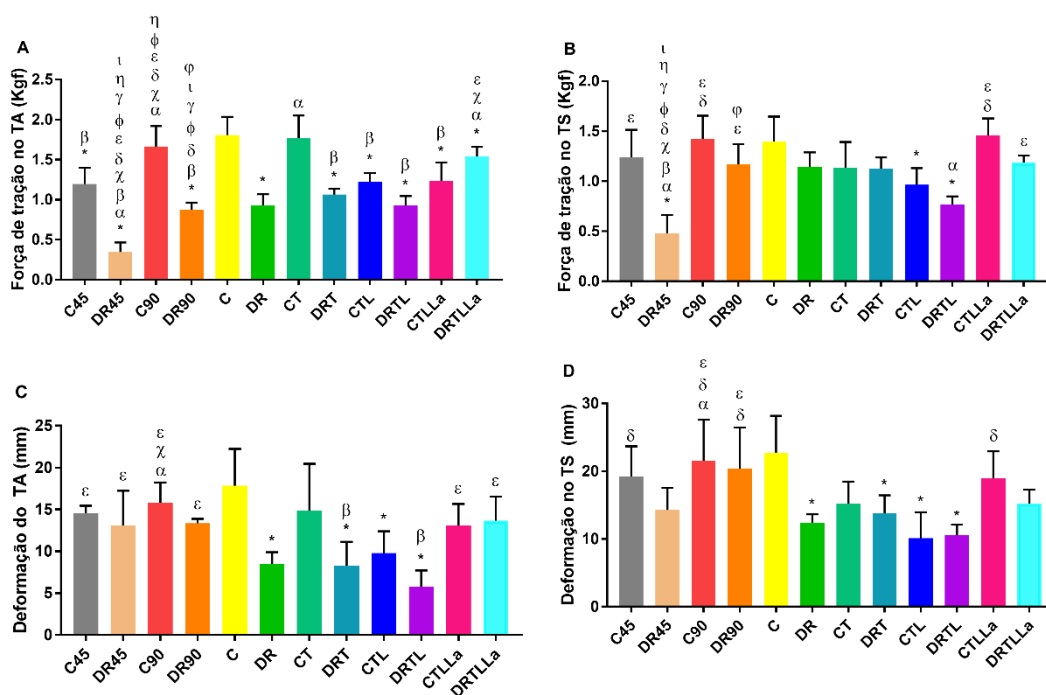


Figura 4 - A: Teste de tração do músculo tibial anterior (AT). B: Teste de tração do músculo tríceps sural (TS). C: Deformação até a ruptura do músculo AT. D: Deformação até a ruptura do músculo TS. * diferença estatística em relação ao grupo C, sendo $p < 0,05$; α diferença estatística em relação ao grupo DR, sendo $p < 0,05$; β diferença estatística em relação ao grupo CT, sendo $p < 0,05$; χ diferença estatística em relação ao grupo DRT, sendo $p < 0,05$; δ diferença estatística em relação ao grupo CTL, sendo $p < 0,05$; ϵ diferença estatística em relação ao grupo DRTL, sendo $p < 0,05$; ϕ diferença estatística em relação ao grupo CTLLa, sendo $p < 0,05$; γ diferença estatística em relação ao grupo DRTLLa, sendo $p < 0,05$; η diferença estatística em relação ao grupo C45, sendo $p < 0,05$; φ diferença estatística em relação ao grupo DR45, sendo $p < 0,05$; ι diferença estatística em relação ao grupo C90, sendo $p < 0,05$.

Em relação ao teste de tração, o qual visa mensurar a força de tração máxima até o rompimento total do músculo, como também, quanto ele se deformou para que isto aconteça, foram analisados os dados e assim, demonstrando que o grupo DR45 resistiu a menores Kgfs até o rompimento do músculo em relação ao C45, tanto para o músculo tibial anterior ($p < 0,001$)(figura 3-A, quanto para o músculo tríceps sural ($p < 0,001$)(figura 4-B). Esse parâmetro se manteve mesmo após a recuperação nutricional, visto que o C90 apresentou resultados superiores em relação ao DR90 ($p < 0,001$) somente no músculo tibial anterior (figura 3-A).

Agora, o músculo tibial anterior do grupo C resistiu mais ao teste de tração quando foi comparado aos grupos DR, DRT, CTL, DRTL, CTLLa e DRTLLa, sendo

$p < 0,05$ para todas as comparações. Já o grupo DR resistiu a menos Kgfs quando comparado ao CT ($p < 0,001$) e DRTLLa ($p < 0,001$) (figura 4-A).

Já o grupo CT, seu músculo tibial anterior foi capaz de aguentar a tração com maiores cargas quando comparado aos grupos DRT, CTL, DRTL, CTLLa, sendo $p < 0,05$ para todas as comparações. Ainda, o grupo DRTLLa resistiu a maiores cargas ao se comparar com os grupos DRT ($p = 0,024$) e DRTL ($p < 0,001$) (figura 4-A).

Ao analisar o músculo tríceps sural, o grupo C teve maior resistência a tração quando comparado aos grupos CTL ($p = 0,011$) e DRTL ($p < 0,001$). Já o grupo CTLLa conseguiu resistir a maior carga de tensão quando se comparou ao CTL ($p = 0,001$) e DRTL ($p < 0,001$). Por fim, o grupo DRTLLa superou a carga de tensão do grupo DRTL ($p = 0,016$), mostrando que a PBM auxilia na resistência a tração, tanto para os animais que se alimentaram com dieta normoproteic, quanto para os que não (figura 4-B).

Sobre a deformação do músculo tibial anterior até seu momento de rompimento total, o grupo C conseguiu se alongar mais que os grupos DR ($p < 0,001$), DRT ($p < 0,001$), CTL ($p = 0,005$) e DRTL ($p < 0,001$). O grupo CT também obteve resultados de maior deformação ao se comparar com os grupos DRT ($p = 0,047$) e DRTL ($p = 0,001$). Ainda, a PBM pode auxiliar no ganho da deformação muscular, uma vez que o grupo DRTL apresentou menores resultados ao se comparar com os grupos CTLLa ($p = 0,018$) e DRTLLa ($p = 0,007$). Já os grupos C45, DR45, C90 e DR90, não apresentaram diferenças entre si.

Já em relação ao músculo tríceps sural, é possível observar que o grupo C resistiu a maior deformação até seu rompimento total, em relação aos grupos DR ($p = 0,007$), DRT ($p = 0,036$), CTL ($p < 0,001$) e DRTL ($p < 0,001$). Já o grupo CTLLa, resistiu a maior deformação quando se comparado ao CTL ($p = 0,041$). Já os grupos C45, DR45, C90 e DR90, não apresentaram diferenças entre si.

Glicogênio Muscular e Teste de Exaustão

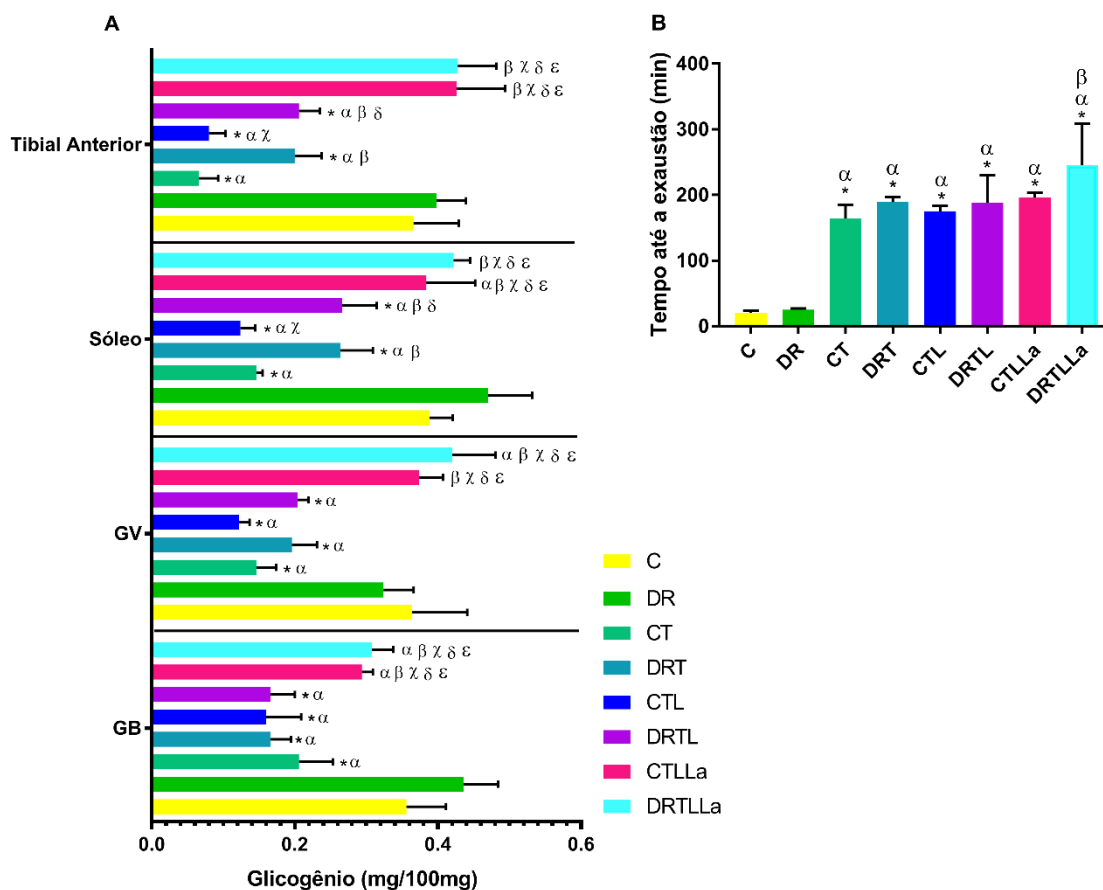


Figura 5 - A: Glicogênio muscular. B: Teste de exaustão. * diferença estatística em relação ao grupo C, sendo $p < 0,05$; α diferença estatística em relação ao grupo DR, sendo $p < 0,05$; β diferença estatística em relação ao grupo CT, sendo $p < 0,05$; χ diferença estatística em relação ao grupo DRT, sendo $p < 0,05$; δ diferença estatística em relação ao grupo CTL, sendo $p < 0,05$; ϵ diferença estatística em relação ao grupo DRTL, sendo $p < 0,05$.

Sobre o glicogênio muscular, é visível que o grupo C e DR, possuem maiores concentrações de glicogênio muscular no GB, GV, Sóleo e Tibial Anterior em relação aos grupos CT, DRT, CTL e DRTL, para todas as comparações $p < 0,05$ (figura 5-A).

Já os grupos que sofreram irradiação após passarem pela criolesão (CTLLa e DRTLLa), apresentaram maiores valores de glicogênio nos músculos GB, GV, Sóleo e Tibial anterior, quando se comparado aos grupos CT, DRT, CTL e DRTL,

para todas as comparações $p < 0,05$, demonstrando que a PBM pode auxiliar na recuperação metabólica muscular.

Ainda, nos músculos sóleo e tibial anterior, os grupos DRT e DRTL obtiveram maiores concentrações de glicogênio em relação aos grupos CT e CTL, para todas as comparações $p < 0,05$.

Sobre o teste de exaustão que visou observar o desempenho físico dos animais para mensurar a performance após uma lesão muscular, afim de comparar com grupos treinados para averiguar se houve uma recuperação completa, foi visto que os grupos C e DR, obtiveram resultados inferiores aos demais grupos que passaram pelo programa de treinamento físico, ainda, o grupo DRTLLa, obteve melhor performance em relação ao grupo CT ($p = 0,031$). As demais comparações não tiveram diferenças significativas (figura 5-B).

DISCUSSÃO

A diminuição da massa corporal é um dos parâmetros para justificar o modelo de desnutrição proteica, esse modelo quando aplicado nos estágios iniciais do desenvolvimento pode acarretar em alterações físicas permanentes, o que justamente foi relatado em nossos resultados, visto que os grupos desnutridos e recuperados nutricionalmente nunca alcançaram o peso dos animais que realizaram a dieta normoproteica, certamente obviamente a baixa disponibilidade de aminoácidos confirmou a indução do quadro de desnutrição (REIS et al., 1997), ainda, por possuir uma diferença maior de 40% da massa corporal nos momentos 45 e 90 dia de experimento, essa diminuição caracteriza uma desnutrição de terceiro grau em humanos (GUERI; GURNEY; JUTSUM, 1980). Esses achados colaboram com as diversas pesquisas (PEZOLATO et al., 2015; JERONIMO et al., 2016; PERTILLE et al., 2016; LOPES et al., 2017), evidenciando a importância da ingestão de aminoácidos nos estágios iniciais de desenvolvimento para que a massa corporal evolua adequadamente e não ocorra alterações permanentes, como visto nesta pesquisa.

Ainda, o exercício aeróbico é capaz de diminuir a massa corporal, como foi relatado no presente estudo, uma vez que os grupos sedentários obtiveram valores elevados do peso, isto porque este tipo de treinamento é capaz de aumentar a sensibilidade da insulina, estimular a lipólise por aumento da circulação de catecolaminas, aumento dos ácidos graxos livres, do hormônio do crescimento e do

glicerol (NASSIS et al., 2005; GOTO et al., 2007). Isto só não ocorreu ao se comparar o grupo DR com o DRT, demonstrando que o fator da lesão pode acarretar na diminuição da massa corporal, visto que ocorre respostas hormonais como a diminuição da sensibilidade a insulina no local, a qual pode promover a perda muscular e a força muscular (WALL; MORTON; VAN LOON, 2015), ainda, o grupo DRTLLa, além de passar pela lesão muscular foi irradiado, assim a PBM pode ter auxiliado na diminuição da massa corporal, já que é capaz de ativar os cromóforos da mitocôndria, aumentando o consumo de oxigênio, conseqüentemente, aumentando as espécies reativas de oxigênio (ROS), liberando óxido nítrico (NO), fatores esses que auxiliam na lipólise (AVCI et al., 2013).

O nível de globulina está diretamente ligado com os anticorpos circulantes, sendo um fator importante para proteção contra infecções, ainda seu nível pode ser elevado quando ocorre lesões teciduais, por uma resposta inflamatória, assim é normal que os níveis de globulina sejam maiores em situações de atividade física aeróbica, ou mesmo lesão muscular (GARRETT; KIRKENDALL, 2000; MEIER et al., 2006), justificando porque o grupo C teve menores concentrações.

Já o nível de albumina e proteínas totais foi baixo no grupo DR45, demonstrando que a insuficiência de aminoácidos na dieta pode acarretar nesta condição, ao contrário do grupo DR90 que possui altos níveis, podendo ser justificada pela deficiência de absorção das mesmas, visto que pode diminuir o diâmetro das fibras muscular, gerar deficiências contráteis do músculo sóleo e TA, induzindo uma predominância de fibras oxidativas (ALVES; DÂMASO; DAL PAI, 2008; ALAVERDASHVILI; LI; PATERSON, 2015; LOPES et al., 2017)

A creatinina é um subproduto do metabolismo da creatina fosfato, fonte de elevada energia, essencial no processo de contração muscular, porém é um marcador de insuficiência renal, desta maneira, é visto seus níveis mais elevados em praticantes de atividade física (KNOCHEL; DOTIN; HAMBURGER, 1974), como relatado nos grupos treinados do presente artigo, no entanto, os grupos que foram desnutridos e recuperados nutricionalmente sempre mantiveram seus níveis mais altos em comparação com os seus controles, assim podendo predizer dano renal, sequela, possivelmente, adquirida pelo quadro de limitação de aminoácidos nas fases de desenvolvimento corporal. Infelizmente, a falta de análises mais profundas da funcionalidade renal não foram feitas, sendo esta uma limitação do presente estudo.

A desnutrição parece influenciar a formação muscular, uma vez que o músculo tibial anterior e tríceps sural do grupo DR45 resistiram pouca carga de tensão no teste de tração mecânica. Mais uma vez enaltecendo a importância da ingestão de aminoácidos nas fases iniciais de desenvolvimento. Ainda, por mais que tenha sido realizada a recuperação nutricional, o músculo tibial anterior suportou menor carga do grupo DR90 em relação ao seu controle, demonstrando as sequelas que a desnutrição pode deixar, podendo facilitar uma lesão muscular, sendo justificado pelas modificações contráteis e elásticas do tecido músculo esquelético frente as modulações na síntese de colágeno e titina nos estados iniciais do crescimento que se penduraram até a fase adulta (TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008).

Ainda, podemos afirmar que os grupos CTL e CTLLa, não tiveram uma recuperação completa do músculo tibial anterior, visto a diferença em relação ao grupo CT, cujo o prazo possa ter sido curto para isto acontecer, diferente do DRTLLa, o qual atingiu a recuperação completa muscular visto seus resultados no teste de tração, uma vez que a fotobiomodulação (PBM), pode ter aumentando a atividade do VEGF, do MyoD, ainda, auxiliando na síntese correta do colágeno (ASSIS et al., 2013), diferente do CTLLa, a desnutrição pode gerar aumento de fibras do tipo I e IIa, com menores proporções do tipo IIb (TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008), visto que o laser de baixa intensidade é capaz de ativar a mitocôndria, melhorando a respiração celular (FERRARESI; HAMBLIN; PARIZOTTO, 2012), pelas fibras de tipo I e IIa terem mais mitocôndrias, pode ter acelerado o processo regenerativo.

Os resultados da deformação só enaltecem a dificuldade dos grupos DRT, DRTL em não conseguirem atingir o nível de elasticidade de um músculo comum, ainda, o grupo DRTLLa obteve melhores resultado em relação ao DRT e DRTL, mais uma vez pelas alterações ditas da PBM (TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008; FERRARESI; HAMBLIN; PARIZOTTO, 2012; ASSIS et al., 2013).

Os grupos CT e DRT, tiveram menores concentrações de glicogênio muscular WG, RG e S, em relação aos grupos C e DR, por mais que o exercício aeróbico aumente a expressão de AKT e da fosforilação do glicogênio sintetase quinase -3β (ZHANG et al., 2007), isto pode ter ocorrido pelo curto período de repouso após o teste de exaustão (3 dias), no entanto os grupos CTLLa e DRTLLa, obtiveram maiores reservas de glicogênio ao se compararem aos CTL e DRTL,

demonstrando que o poder da luz pode aumentar as reservas de glicogênio e auxiliar em uma recuperação precoce, ainda mais pelo fato que o teste de exaustão demonstrou que o grupo DRTLLa obteve melhores resultados em relação ao CT. Ainda, o exercício físico precoce a lesão muscular é capaz de manter os parâmetros de performance no exercício aeróbico de longa duração, como visto na figura 4-B, reforçando a intervenção precoce nesses casos, ainda mais com o auxílio da PBM para aumentar as reservas de glicogênio. Por fim, parece que a desnutrição e recuperação nutricional, não afetam, negativamente, a recuperação após uma lesão muscular nos parâmetros de performance, mas podem gerar danos permanentes nos rins e na estrutura contrátil e de deformação muscular, possibilitando uma maior chance de lesão.

CONCLUSÃO

A desnutrição proteica é capaz de gerar danos permanentes no crescimento corpóreo e nas estruturas relacionadas a resistência muscular a tensão, podendo facilitar o rompimento muscular com uma menor carga imposta, no entanto, com a utilização da PBM, é visível a melhora na resistência, podendo ele ser utilizado nos protocolos de reabilitação, juntamente com o treino físico. Ainda mais, por ser capaz de aumentar as reservas de glicogênio, facilitando a recuperação para uma melhora precoce na performance em exercícios aeróbicos de longa duração. Por fim, a PBM parece ser capaz de diminuir o nível sérico de creatinina, porém esse parâmetro deve ser melhor investigado.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALAVERDASHVILI, M.; LI, X.; PATERSON, P. G. Protein-Energy Malnutrition Causes Deficits in Motor Function in Adult Male Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 11, p. 2503–2511, 1 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26423735>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ALVES, A. P.; DÂMASO, A. R.; DAL PAI, V. Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular

estriado esquelético em ratos. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 3, p. 264–271, jun. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572008000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ASSIS, L. et al. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 3, p. 947–955, 17 maio 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10103-012-1183-3>>. Acesso em: 9 jan. 2019.

AVCI, P. et al. Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review. **Lasers in surgery and medicine**, v. 45, n. 6, p. 349–57, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749426>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

BLÖSSNER, M. et al. Malnutrition Quantifying the health impact at national and local levels World Health Organization Nutrition for Health and Development Protection of the Human Environment Geneva 2005 WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2005. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43120/9241591870.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

BRITO VIEIRA, W. H. et al. Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 74, n. 2, p. 444–9, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166329>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

CALDERS, P. et al. Effect of branched-chain amino acids (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 4, p. 583–7, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211856>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

BRITO VIEIRA, W. H. et al. 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 in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 497–504, 26 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21870127>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

FERRARESI, C. et al. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 9, p. 740–754, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378263>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

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 in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 267–286, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/plm.2012.1.issue-4/plm-2012-0032/plm-2012-0032.xml>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

FERREIRA, J. C. et al. MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING MICE: EFFECT OF EXERCISE TRAINING. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, ago. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

FILIPPIN, L. I. et al. The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. **Inflammation Research**, v. 60, n. 4, p. 347–356, 13 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076852>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

GALDINO, R. et al. Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise-training. **Nutrition Research**, v. 20, n. 4, p. 527–535, 1 abr. 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531700001445>>. Acesso em: 20 set. 2019.

GARRETT, W. E.; KIRKENDALL, D. T. **Exercise and sport science**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GOTO, K. et al. Enhancement of fat metabolism by repeated bouts of moderate endurance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 6, p. 2158–2164, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/jappphysiol.01302.2006>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

GUERI, M.; GURNEY, J. M.; JUTSUM, P. The Gomez classification. Time for a change? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 5, p. 773–7, 1980.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6975186>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

JERONIMO, L. C. et al. Morphological and Morphometric Study of the Muscle Fibers and Neuromuscular Junctions of the Extensor Digitorum Longus in Aged Rats Submitted to Maternal Protein Restriction. **International Journal of Morphology**, v. 34, n. 1, p. 396–403, mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022016000100057&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 8 dez. 2018.

KNOCHEL, J. P.; DOTIN, L. N.; HAMBURGER, R. J. Heat Stress, Exercise, and Muscle Injury: Effects on Urate Metabolism and Renal Function. **Annals of Internal Medicine**, v. 81, n. 3, p. 321, 1 set. 1974. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-81-3-321>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

LIMA-CABELLO, E. et al. Eccentric exercise induces nitric oxide synthase expression through nuclear factor- κ B modulation in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 3, p. 575–583, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20044475>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

LIMA, S. et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 4, p. 297–302, ago. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-35552007000400009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 8 jan. 2019.

LO, S.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 28, n. 2, p. 234–236, fev. 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5413312>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

LOPES, T. de S. et al. Protein Malnutrition Pre- and Postnatal and Nutritional Rehabilitation Modulates the Morphology of Muscle Fibers in Wistar Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, n. 3, p. 278–287, 4 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558017>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

MALAGUTI, M. et al. Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1028–1036, out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19713431>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

MEIER, U. et al. Gc-globulin: roles in response to injury. **Clinical chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1247–53, 1 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274031>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

MIYABARA, E. H. et al. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 290, n. 4, p. C1128–C1138, abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291818>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

NASSIS, G. P. et al. Aerobic exercise training improves insulin sensitivity without changes in body weight, body fat, adiponectin, and inflammatory markers in overweight and obese girls. **Metabolism**, v. 54, n. 11, p. 1472–1479, 1 nov. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049505002210>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

OLIVEIRA, E. C. de et al. Treino físico promove aumento de peso em ratos desnutridos sem causar stress oxidativo. **Motricidade**, v. 11, n. 2, p. 25–35, 28 jun. 2015. Disponível em: <<http://revistas.rcaap.pt/motricidade/article/view/3175>>. Acesso em: 9 jan. 2019.

PERTILLE, A. et al. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 83–91, 4 jul. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842017000100083&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 8 dez. 2018.

PEZOLATO, V. A. et al. Perfil hematológico de ratos submetidos a desnutrição protéica e recuperação nutricional. **Biomotriz**, v. 9, n. 2, 13 dez. 2015. Disponível em: <<http://revistaelectronica.unicruz.edu.br/index.php/BIOMOTRIZ/article/view/1996>>.

Acesso em: 8 dez. 2018.

PRADA, F. J. A.; MACEDO, D. V.; MELLO, M. A. R. de. Oxidative stress during rehabilitation from protein malnutrition associated with aerobic exercise in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 45–55, jan. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132007000100006&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 9 jan. 2019.

REIS, M. A. B. et al. Glucose-Induced Insulin Secretion Is Impaired and Insulin-Induced Phosphorylation of the Insulin Receptor and Insulin Receptor Substrate-1 Are Increased in Protein-Deficient Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 3, p. 403–410, 1 mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082023>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

RENNÓ, A. C. M. et al. Comparative Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Low-Level Laser Therapy on Injured Skeletal Muscle. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 1, p. 5–10, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166589>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

RODRIGUES, L. D. et al. Manual de Cuidados e Procedimento com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. 1. ed. [s.l: s.n.]

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 246–264, 12 set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504762>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

SIU, P. M. et al. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 2, p. 555–560, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531911>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

TOSCANO, A. E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270–278, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18312789>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determinação da transição metabólica através do teste de lactato mínimo em ratos desnutridos durante o exercício de natação. **Revista da Educação Física**, v. 18, n. 1, p. 33–39, 2007.

WALL, B. T.; MORTON, J. P.; VAN LOON, L. J. C. Strategies to maintain skeletal muscle mass in the injured athlete: Nutritional considerations and exercise mimetics. **European Journal of Sport Science**, v. 15, n. 1, p. 53–62, 2 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17461391.2014.936326>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ZHANG, K.-R. et al. Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. **Apoptosis**, v. 12, n. 9, p. 1579–1588, 25 jul. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10495-007-0090-8>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

4. Estudo III

Acompanhamento da condição cardíaca frente ao exercício aeróbico com periodização linear, associado ou não a fotobiomodulação em ratos desnutridos e recuperados nutricionalmente.

Acompanhamento da condição cardíaca frente ao exercício aeróbico com periodização linear, associado ou não a fotobiomodulação em ratos desnutridos e recuperados nutricionalmente.

Vitor Alexandre Pezolato¹, Rodrigo Dias², Ana Laura Martins de Andrade¹, Carlos Alberto da Silva³, Nivaldo Antonio Parizotto⁴

1. Doutorando de Fisioterapia pela Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, SP.
2. Professor Titular da Educação Física da Associação de Ensino Superior do Piauí, AESPI, PI.
3. Professor Titular de Fisioterapia pela Universidade Paulista - UNIP, SP.
4. Professor Titular da Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, SP.

ENDEREÇO:

Universidade Metodista de Piracicaba – Rodovia do Açúcar, km156 (SP-308)

CEP: 13,423-170 – Piracicaba, SP – Brasil

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – Rodovia Washington Luis, Km 235 (SP-310)

CEP: 13,565-905 – São Carlos, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Vitor Alexandre Pezolato

Vitor.pezolato@gmail.com

RESUMO

A desnutrição proteica pode ocorrer devido a falta de proteínas, carboidratos e/ou lipídios. Essa carência pode acarretar em um quadro com déficits neuropsicomotor, sendo que grande parte deles não são recuperados ao realizar uma recuperação nutricional. Desta maneira, este estudo visou observar os efeitos deletérios da desnutrição no músculo cardíaco, observando se a recuperação proteica, associada ou não com exercícios físicos aeróbicos podem ser suficientes para ter uma reabilitação completa, ainda mais quando for associado com a fotobiomodulação. Sessenta e três ratos *Wistar* foram utilizados, sendo aleatoriamente divididos em 6 grupos, contendo 7 animais em cada, assim denominados: Controle (C), Controle Treinado (CT), Controle Treinado e Irradiado (CTLa), Desnutrido Recuperado (DR), Desnutrido Recuperado Treinado (DRT), Desnutrido Recuperado e Irradiado (DRTL_a). Foi realizado um treino periodizado com polimento linear, juntamente, ou não, com a fotobiomodulação com fluência de 214J/cm², potência de 100mW e comprimento de onda de 780nm. Assim, foram feitas análises eletrocardiográficas em diferentes momentos, além de colesterol total e triglicérides. Os resultados demonstram que os grupos irradiados possuem maior frequência cardíaca que os demais grupos treinados, ainda, os parâmetros do eletrocardiograma demonstram que animais que passam pela desnutrição proteica possam ter quadros de extra-sístole, arritmia, momentos de taquicardia e bradicardia, sendo que essas alterações são corrigidas ao iniciar o treinamento físico aeróbico. Desta maneira, a fotobiomodulação pode aumentar a frequência cardíaca em animais treinados e esse treinamento pode corrigir as alterações negativas impostas no perfil elétrico cardíaco pela desnutrição proteica.

Palavras-chave: desnutrição, exercício físico, eletrocardiograma

ABSTRACT

Protein malnutrition can occur due to lack of protein, carbohydrates and / or lipids. This deficiency can lead to neuro-psycho-motor deficits, and most of them are not recovered during nutritional recovery. In this way, this study aimed to observe the deleterious effects of malnutrition on the cardiac muscle, observing whether protein recovery, associated or not with aerobic physical exercises may be enough to have a complete rehabilitation, even more when it is associated with photobiomodulation. Sixty-three Wistar rats were randomly divided into six groups, containing 7 animals each, so-called: Control (C), Controlled Trained (CT), Trained and Irradiated Control (CTLa), Recovered Malnourished (DR), Malnourished Recovered Trained (DRT), Malnourished Recovered Trained and Irradiated (DRTL_a). A periodic training with linear polishing was carried out, together or not, with photobiomodulation with fluence of 214J / cm², power of 100mW and wavelength of 780nm. Thus, electrocardiographic analyzes were performed at different times, in addition to total cholesterol and triglycerides. The results show that the irradiated groups have a higher heart rate than the other trained groups; however, the electrocardiogram parameters show that animals suffering from protein malnutrition may have extrasystoles, arrhythmia, moments of tachycardia and bradycardia and these changes are corrected when beginning aerobic physical training. In this way, the photobiomodulation can increase the heart rate in trained animals and this training can correct the negative changes imposed in the electric cardiac profile by protein malnutrition.

Keywords: malnutrition, physical exercise, electrocardiogram

INTRODUÇÃO

A desnutrição proteica é uma condição patológica decorrente das deficiências de substratos energéticos e proteínas, a qual atinge em sua maioria as crianças, principalmente do continente africano (WHO, 2018).

Na literatura científica é visível que dentre os inúmeros modelos experimentais aplicados ao estudo sobre desnutrição, o modelo de desnutrição crônica precoce, por restrição proteica na ingesta alimentar, podendo até ser caracterizada como Kwashiorkor, é o mais semelhante ao que acontece na população infantil e merecedor de maiores estudos devido sua importância social e científica (NUNES et al., 2002; ABALAN et al., 2010).

Visto a importância da ingestão correta de aminoácidos nos estágios iniciais do desenvolvimento, uma vez que sua falta pode alterar o funcionamento celular, com maior ou menor intensidade, dependendo do tecido, isso irá gerar grande comprometimento na funcionalidade para se manter a homeostasia, levando até danos irreparáveis (XI et al., 2011).

O coração é um dos tecidos que sofrem com os efeitos deletérios da desnutrição, de forma similar do efeito catabólico produzido no musculoesquelético, podendo levar a um coração hipotrófico (DROTT; LUNDHOLM, 1992). Importante ressaltar que, no que diz respeito a recuperação nutricional, não há consenso, havendo autores que indicam reversão do quadro, enquanto outros observam somente recuperação parcial (SILVERMAN et al., 2016 ; EL-SAYED et al., 2006).

Ainda, países da África, como a República da Quênia, sofrem com elevados índices de desnutrição infantil, sendo que parte desses indivíduos passam por uma recuperação nutricional, ainda, esses países migram muitos dos seus atletas para outros locais mais desenvolvidos, realçando que ao se falar de corrida de longa duração, seus atletas são os grandes campeões nos últimos anos (SIMIYU NJORORAI, 2010; WHO, 2018).

Visto que esses corredores são baixos, finos, com a quantidade de gordura corporal mínima, com baixo desenvolvimento do tecido muscular, ainda assim possuem uma extrema capacidade em provas de longa duração, principalmente corrida, possivelmente, por mobilizarem, mais facilmente, o glicogênio muscular e terem uma alta oxidação de carboidratos, sendo que essas condições, são muitas vezes justificadas pelas condições sociais, culturais, econômicas que fizeram esses atletas

passarem por extrema dificuldade em sobreviver (BLÖSSNER et al., 2005; EKSTEROWICZ; NAPIERAŁA; ŻUKOW, 2016; WHO, 2018).

As características físicas destes quenianos se deparam com as características de indivíduos, os quais passaram pela desnutrição proteica e recuperação nutricional, desta maneira, há um leque sobre a falta de informações que correlacionam esse perfil metabólico com o exercício físico de alta duração, assim como o funcionamento cardíaco ao longo de todo o processo.

Ainda, sabendo que a fotobiomodulação (PBM) no exercício físico é capaz de melhorar a performance aeróbica, reduzindo o estresse oxidativo, diminuindo o índice de fadiga (DE MARCHI et al., 2012), diminuindo o nível sérico de lactato (ASSIS et al., 2015), aumentando o processo da angiogênese (ADABBO et al., 2016), estimulando as células satélites (FERRARESI; HAMBLIN; PARIZOTTO, 2012), aumentando a força muscular (FERRARESI; OLIVEIRA; ZAFALON, 2011), diminuindo os marcadores inflamatórios (ZAGATTO et al., 2016), é necessário que pesquisas desmistifiquem se a fotobiomodulação poderia auxiliar o tecido musculoesquelético em situação de desnutrição e recuperação nutricional.

Desta maneira, este estudo visa observar se os efeitos deletérios no músculo cardíaco causado pela desnutrição proteica são reversíveis tanto em condições normais, quando em associação ao treinamento físico periodizado, ainda, averiguar se a PBM é capaz de acelerar esse processo, ou mesmo contribuir com funcionamento cardíaco.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais:

Foram utilizados 63 ratos da linhagem *Wistar* (*Rathus norvegicus* var, *albinus*, *Rodentia*, *Mamalia*), desmamados no 21º dia de vida, provenientes da empresa *Anilab*® (Paulínia-SP). Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas coletivas contendo 5 e 7 animais por gaiola para os animais submetidos a adequada condição nutricional proteica e aos animais submetidos a condição de desnutrição/recuperação proteica, respectivamente.

Ademais, os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 ± 2 °C e iluminação adequada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6:00 horas. Ressalta-se que, com relação à limpeza das gaiolas, foi adotado o procedimento de se transferir pequena

porção do material da gaiola suja (maravalha com fezes e urina) para a gaiola limpa, sendo em seguida, adicionada mais maravalha limpa e realizada a homogeneização da maravalha objetivando a manutenção das marcas olfatórias e conseqüentemente a estabilidade da hierarquia social dos animais em cada gaiola, reduzindo possíveis picos de estresse (RODRIGUES et al., 2013).

Ainda, durante todo o período experimental, os animais foram continuamente expostos de forma sistemática/organizada a diferenciadas condições de ambiente enriquecido, considerando orientações previamente publicadas (RODRIGUES et al., 2013), a fim de minimizar a monotonia da confinção e proporcionar maior possibilidade de interações naturais da espécie no que diz respeito as questões ambientais e sociais. Reconhecidamente, a condição de ambiente enriquecido, apresenta potencial para minimizar o nível de estresse e, conseqüentemente, aumento das possibilidades de obtenção de animais mais estáveis com relação aos parâmetros fisiológicos e psicológicos (SIMPSON; KELLY, 2011), assegurando melhores resultados científicos.

Os animais foram tratados de acordo com as recomendações do *Guide for Care Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996), sendo o trabalho aprovado pela Comissão de Experimentação Animal da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) sob protocolo de número 04/16.

Experimental Groups

Após o período de desmame dos animais, os mesmos foram aleatoriamente divididos em 6 grupos, contendo 7 animais em cada, assim denominados: Controle (C), Controle Treinado (CT), Controle Treinado e Irradiado (CTLa), Desnutrido Recuperado (DR), Desnutrido Recuperado Treinado (DRT), Desnutrido Recuperado e Irradiado (DRTL). O grupo C e DR no dia 45 de experimento será titulado como C45 e DR45, respectivamente, no dia 90 de experimento, C90 e DR90, respectivamente. O período total de experimento foi de 129 dias, sendo que do dia 90 até o dia 126 houve o treinamento físico, e o último dia, as coletas.

Desenho Experimental

Inicialmente os grupos C, CT, CTLa passaram pela dieta normoproteica (AN 93 M 14%) durante todo o experimento e os grupos DR, DRT, DRTL, passaram por

uma dieta hipoproteica (AN 6%) por 45 dias, causando o estado de desnutrição proteica e foram recuperados com dieta normoproteica durante 45 dias.

Ao atingirem o 83º dia de experimento, os grupos passaram por um protocolo de adaptação na esteira e, posteriormente, por um programa de treinamento físico, o qual se inicia no dia 90º e dura 36 dias, com exceção dos grupos C e DR.

Os grupos CTLa e DRLa receberam irradiação de laser de baixa intensidade após cada sessão de treinamento. Vide Figura 1 para melhor visualização do desenho experimental.

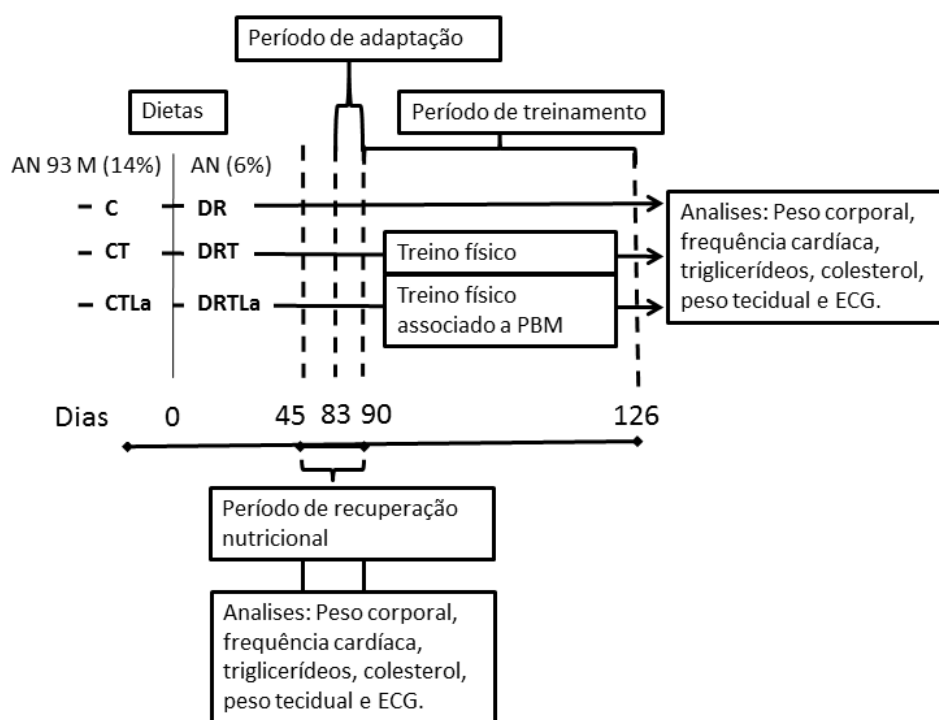


Figura 6 - Desenho experimental, seguindo uma linha temporal com as análises que foram realizadas em cada momento.

Protocolo de Desnutrição e Recuperação Nutricional

Os animais dos grupos C, CT e CTLa foram alimentados com dieta normoproteica AIN 93 M, contendo 14% de proteína, enquanto os animais dos grupos DR, DRT, DRTL a foram alimentados com dieta hipoproteica AN contendo 6% de proteína por 45 dias, alimento comercializado pela PragSoluções Serviços e Comércio Ltda. Posteriormente, os animais passaram pelo processo de recuperação nutricional, sendo alimentados com dieta normoproteica AIN 93 M, contendo 14% de proteína pelo período de 45 dias. As composições das referidas dietas estão previamente descritas (Tabela 1).

Tabela 8 - Composição das dietas (g/Kg) utilizadas para desnutrição recuperação nutricional.

<i>Dieta AN 93 M -14%</i>		<i>Dieta AN - 6% proteína (desnutrição)</i>	
Ingredientes	p/1 Kg	Ingredientes	p/1 Kg
Amido de milho	465.700	Amido de milho	508.000
Caseína	140.000	Caseína	66.000
Amido dextrinizado	155.000	Amido	166.500
Sacarose	100.000	Sacarose	121.000
Óleo de soja	40.000	Óleo de soja	40.000
Fibra (Cel. Microcrist.)	50.000	Fibra (Cel.)	50.000
L-cistina	1.800	L-cistina	1.000
Cloreto colina	2.500	Cloreto colina	2.500
Mix mineral G	35.000	Mix mineral G	35.000
Mix vitamínico	10.000	Mix vitamínico	10.000
TOTAL	1000.0	TOTAL	1000.0

Esteira e Adaptação dos Animais

Para realizar os programas de treinamento físico, foi utilizada uma esteira ergométrica da marca Rebook TR2 Premierrun Treadmill® (Adidas do Brasil, Embú, SP, Brasil), apresentando 8 raias, com marcação de velocidade em metros por minuto (m/min) e inclinação automática. Os animais receberam treinamento passaram pela adaptação na esteira na última semana de recuperação nutricional representando os dias 83 até o dia 90 de experimento. O protocolo de adaptação consistiu na colocação dos animais na esteira durante uma semana, sem inclinação, com aumento progressivo da velocidade até alcançar 18 m.min⁻¹ (valor médio da primeira semana de treinamento), com aumento progressivo do tempo de corrida até alcançar 15 minutos.

Programa de Treinamento Físico Periodizado com Polimento Linear

O protocolo de treinamento aeróbio foi realizado diariamente, de segunda-feira a sexta-feira, durante 36 dias, no período da tarde. Este protocolo apresenta

periodização do volume e da intensidade obedecendo períodos de descanso ativo (Tabela 2).

Tabela 9 - Protocolo de treinamento, demonstrando a duração do treino em minutos, velocidade em metros por minuto ($m \cdot min^{-1}$) e a carga de treino.

Dia	Volume (min)	Intensidade ($m \cdot min^{-1}$)	Carga de treino (Volume x intensidade) = u.a.)
1	20	16	320
2	30	17	510
3	40	18	720
4	45	19	855
5	50	20	1000
6	0	-	-
7	0	-	-
8	60	20	1200
9	60	20	1200
10	60	20	1200
11	60	20	1200
12	60	22	1320
13	0	-	-
14	0	-	-
15	60	22	1320
16	60	24	1440
17	60	22	1320
18	60	24	1440
19	60	22	1320
20	0	-	-
21	0	-	-
22	60	24	1440
23	60	24	1440
24	60	24	1440

25	60	24	1440
26	60	24	1440
27	0	-	-
28	0	-	-
29	0	-	-
30	50	24	1200
31	40	24	960
32	35	24	840
33	30	24	720
34	25	24	600
35	0	-	-
36	0	-	-

Esta graduação tem o intuito de possibilitar uma adaptação dos animais ao treinamento, preconizando, assim, um predomínio do treinamento aeróbio. Sua intensidade foi calculada seguindo os níveis de lactato encontrado nos estudos de Ferreira (FERREIRA et al., 2007) e Brito Vieira (BRITO VIEIRA et al., 2014) e no teste de máxima fase estável de lactato (MFEL).

O início do treinamento foi realizado com carga de trabalho menor (10% de velocidade e tempo predeterminados para o dia) como forma de aquecimento, conforme previamente preconizado (SIU et al., 2003).

Fotobiomodulação

Foi utilizado o laser de baixa intensidade GaAlAs (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil), sendo este calibrado e aferido antes do procedimento experimental, seguindo os parâmetros do estudo de Brito Vieira (BRITO VIEIRA et al., 2012) (Table 3).

As irradiações foram realizadas de modo pontual, no ventre muscular do tibial anterior e tríceps sural imediatamente após as sessões do exercícios físicos, visando aproveitar as condições de “estresse físico” e, conseqüentemente, de alterações metabólicas do animal, tendo em vista maior eficácia do laser nessas condições (FERRARESI et al., 2015).

Todos os animais foram tricotomizados na região em que receberam as irradiações, e durante a aplicação foi utilizada uma manta de algodão para conter o animal.

Tabela 10 - Parâmetros de aplicação do laser de baixa intensidade GaAlAs

Parâmetros	Valores
Potência (mW)	70
Comprimento de Onda (nm)	780
Mode de Aplicação	Contínuo
Área transversa de saída do laser (cm ²)	0.04
Fluência (J/cm ²)	214
Tempo (s)	122
Energia (J)	8,54

Determinação do peso corporal, da altura corporal e cálculo do índice de massa corporal (IMC)

Os animais foram pesados através da balança digital (Indústria Filizola, São Paulo, SP, Brasil) nos dias 0, 45, 90 e 126 de experimento. O tamanho foi similarmente avaliado nos mesmo momentos, sendo os resultados expressos em cm, utilizando-se para tanto, uma régua flexível da marca Nitrogême Agropecuária (Nitrogême, São Paulo, SP) e considerando orientações previamente publicadas (NOVELLI et al., 2007). Ademais, foi avaliado o IMC através da divisão dos valores da massa corporal pelo tamanho elevado ao quadrado de cada animal, sendo os resultados expressos em g.cm² (NOVELLI et al., 2007).

Determinação do eletrocardiograma de repouso, coleta e massa dos tecidos e determinação do índice da massa dos tecidos

Para coleta das amostras, os ratos foram anestesiados com mistura de cloridrato de ketamina (Dopalen[®])(Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínea, SP, Brasil), e cloridrato de xilazina (Rompun[®])(Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil), via intraperitoneal, considerando as orientações previamente publicadas de 0,1mL.100g⁻¹ e 0,07mL.100g⁻¹, respectivamente (RODRIGUES et al., 2013). Sendo confirmado a inexistência de estímulos dolorosos, procedeu-se ao monitoramento do

eletrocardiograma (ECG), em seguida decapitação e retirada dos tecidos, os quais foram congelados no biofreezer à -70°C.

Para determinar o peso dos tecidos, os mesmos foram pesados em uma balança digital da marca Mettler Toledo PB303. Em seguida, para determinar o índice da massa dos tecidos, foi realizado a divisão da massa tecidual pela massa corporal momentânea de cada animal.

Para determinação do ECG de repouso, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, via intraperitoneal. A análise do ECG será procedida por meio do eletrocardiógrafo da marca *HeartWare*[®] e pelo programa *Heart Ware System*[®]. Para tanto, os eletrodos foram conectados aos canais de um computador, e devidamente posicionados ao animal, sendo registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF) com velocidade de 50 mm/s. O intervalo QT será medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isoeletrica. Ademais, o intervalo QT será corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de *Bazett*. Os valores referidos são da derivação DII.

Determinação do Colesterol Total e Triglicérides

Para a determinação do LDL-colesterol, HDL-colesterol, colesterol total, serão utilizadas as técnicas de rotina de laboratórios de hematologia, sendo os resultados expressos em mg/dL.

Análise Estatística

Os dados coletados foram tabulados e posteriormente analisados pelo *software* estatístico “GraphPad Prism 7”. A análise estatística foi procedida pela aplicação do teste Shapiro-Wilk para verificação da normalidade.

Os dados que se demonstraram paramétricos passaram pela análise de variância de uma via (one-way ANOVA), quando foi o caso, de duas vias (two-way ANOVA) seguido do teste de Tukey, enquanto as variáveis que se demonstrarem não paramétricas passaram pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de $p < 0,05$ para significância estatística.

RESULTADOS

IMC e Índice de massa dos tecidos

Ao observar os resultados oriundos do índice de massa corporal, é visível que houve diferença estatística do grupos C45 em relação ao grupo DR45 ($p < 0,0001$), sugerindo que a desnutrição pode afetar, negativamente o IMC, no entanto, depois de iniciado a recuperação nutricional, o IMC no dia 90 de experimento não teve diferença estatística entre os grupos C90 e DR90 ($p = 0,2906$), sugerindo que o índice de massa em relação a altura foi recuperado (Figura 2-A). Não houve diferença ao se comparar os demais grupos do experimento.

Já o índice de peso do coração é maior nos animais desnutridos em relação ao grupo controle no momento do dia 45 de experimento (C45 vs DR45 $p < 0,0001$), ainda, o grupo DRTL_a, obteve maiores valores ao se comparar com o grupo C e CT ($p = 0,011$ e $p = 0,0335$, respectivamente), sugerindo que o quadro de desnutrição, juntamente com o efeito da PBM, podem acarretar em níveis mais elevados do índice de massa do coração em relação a animais que passaram por dieta normoproteic e são sedentários, ou mesmo treinados (Figura 2-B).

Ainda, ao observar o índice de massa do pulmão, o grupo C45 apresenta diferença estatística em relação ao grupo DR45 ($p < 0,0001$), e mesmo que o animal seja recuperado nutricionalmente a diferença se mantém, como visto entre os grupos C90 e DR90 ($p = 0,0051$). Para finalizar, o grupo CT, obteve valores inferiores ao se comparar com o grupo DR e DRT ($p = 0,0467$ e $p = 0,0021$, respectivamente), demonstrando que a desnutrição pode influenciar o índice de massa pulmonar (Figura 2-C).

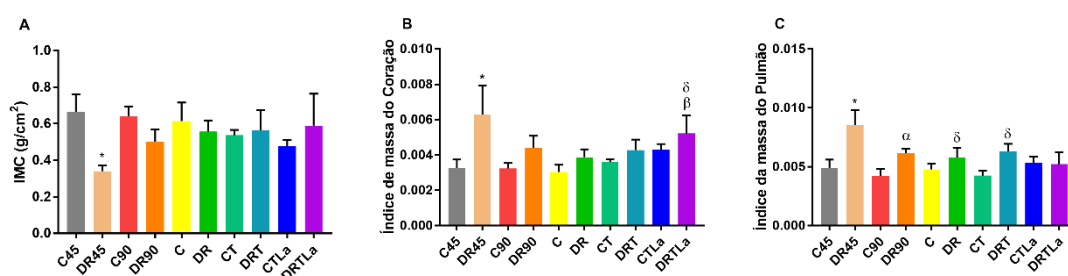


Figura 7 – A: Índice de massa corporal (IMC), B: Índice de massa do coração, C: Índice de massa do pulmão. Para todos os gráficos foi atribuído * para $p < 0,05$ em relação ao grupo C45, α para $p < 0,05$ em relação ao grupo C90, β para $p < 0,05$ em relação ao grupo C, δ para $p < 0,05$ em relação ao grupo CT.

Frequência cardíaca (FC), colesterol total e triglicerídeos

Após os 45 dias de ingestão de dieta hipoproteica, o grupo DR45 apresenta diferença estática em relação ao grupo C45 ($p < 0,0001$), sendo que esse quadro será mantido até o dia 90 de experimento, quando é observado que o grupo DR90 apresenta valores inferiores ao grupo C90 ($p < 0,0001$) (Figura 3-A).

Ao final do período de treinamento, os grupos DR, CT, DRT e DRTL_a, mostraram terem menores valores de frequência cardíaca em relação ao grupo C, demonstrando que o exercício pode diminuir a FC ($p < 0,0001$, $p = 0,0037$, $p < 0,0001$ e $p = 0,0491$, respectivamente).

Ainda, o grupo DR tem menores valores de FC em relação ao grupo CT ($p = 0,004$), CTL_a ($p < 0,0001$) e DRTL_a. ($p < 0,0001$) (Figura 3-A).

No entanto, os grupos que passaram por irradiação após o exercício físico apresentam maiores valores de FC, em relação aos animais que só realizam o treino periodizado, visto as diferenças entre CT e CTL_a ($p = 0,003$) e DRT e DRTL_a ($p = 0,0109$) (Figura 3-A).

Já o nível de colesterol, somente o grupo CT apresentou valores inferiores em relação aos grupos C ($p < 0,0001$), DR ($p < 0,0001$), DRT ($p = 0,0031$) e CTL_a ($p < 0,0001$), vide Figura 3-B.

Em relação ao nível sérico de triglicerídeos, o grupo DR45 apresenta menores concentrações em relação ao grupo C45 ($p = 0,0099$), algo que foi revertido ao andar do desenvolvimento corpóreo com a dieta normoproteica, no entanto o grupo DR apresenta valores maiores se comparado ao grupo DRT ($p = 0,0268$), mostrando que o exercício pode modular os valores do triglicerídeos em animais que passaram por desnutrição e recuperação nutricional (Figura 3-C).

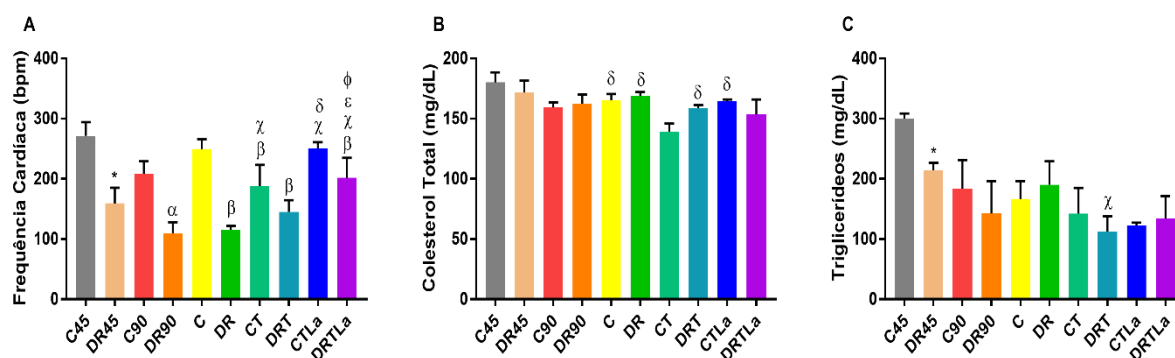


Figura 8 – A: frequência cardíaca. B: Colesterol Total. C: Triglicerídeos. Para todos os gráficos foi atribuído * para $p < 0,05$ em relação ao grupo C45, α para $p < 0,05$ em relação ao grupo C90, β para $p < 0,05$ em relação ao grupo C, χ para $p < 0,05$ em relação ao grupo DR, δ para $p < 0,05$ em relação ao grupo CT, ϵ para $p < 0,05$ em relação ao grupo DRT, ϕ para $p < 0,05$ em relação ao grupo CTL_a.

Eletrocardiograma

Analisando o ECG, ao observar as ondas de maneira isolada (Figura 4), é visível que não há diferenças estatísticas entre os grupos ao observar a onda P, o complexo QRS, o intervalo PR, o segmento ST e o intervalo QTc, no entanto a onda R tem sua voltagem elevada ao se comparar os grupos DR ($p=0,0026$), CT ($p=0,0090$) e DRTL_a ($p<0,0001$) em relação ao C (Figura 5-C).

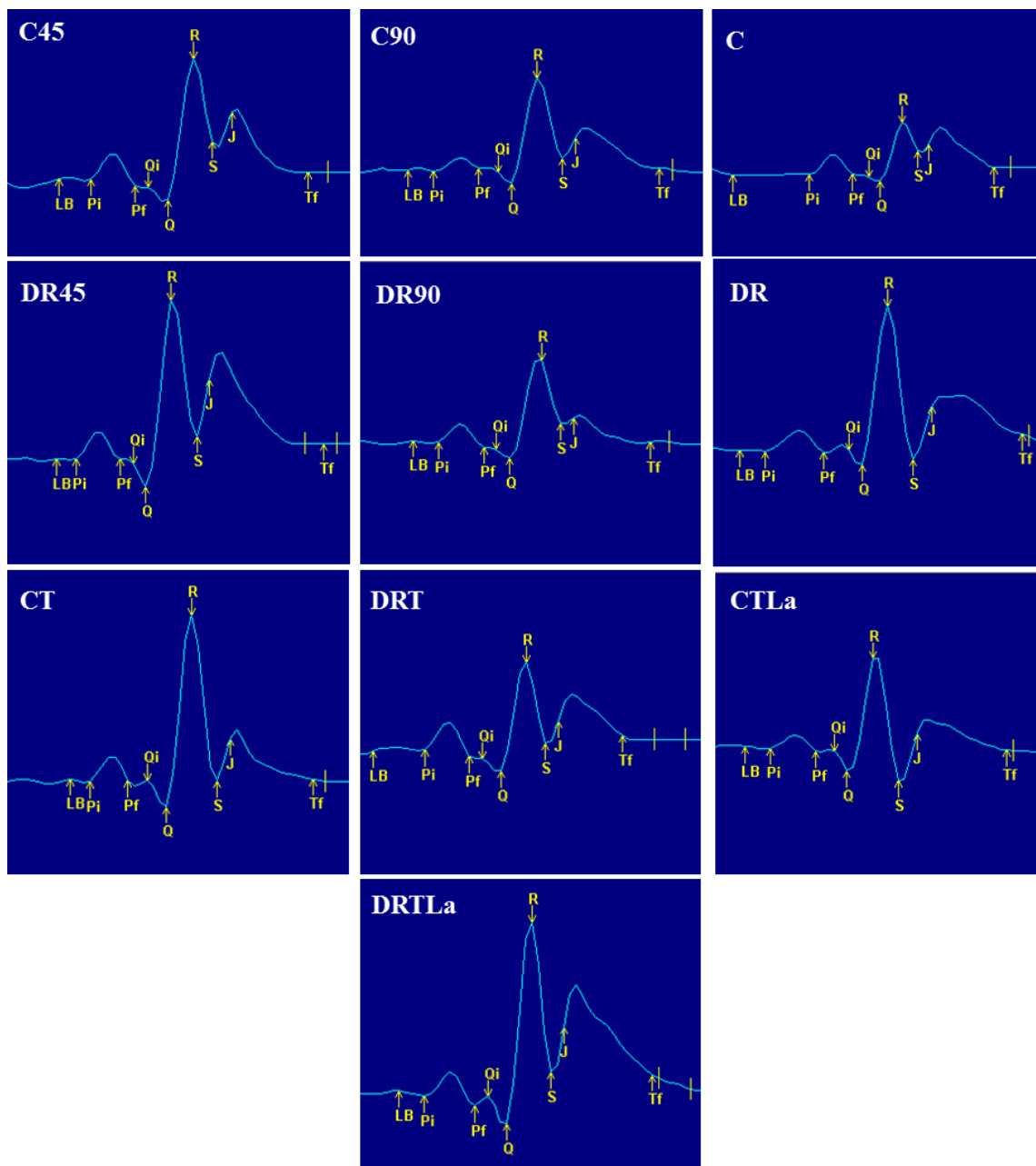


Figura 9 – Demonstração das ondas isoladas do ECG, nos diferentes grupos, sendo apontadas os picos de cada onda.

Agora, ao analisarmos o registro inteiro, é visto sinais de bradicardia, arritmia, seguida de taquicardia e extra-sístoles no grupo DR45, assim como sinais

de extra-sístole no grupo DR90 e DR, sugerindo que a desnutrição proteica, nos estágios iniciais do desenvolvimento pode acarretar em alterações na condução elétrica cardíaca, mesmo que haja recuperação nutricional adequada. No entanto, nos grupos treinados, mesmo os DRT e DRTL_a, não apresentaram sinais negativos no registro completo do ECG (Figura 6).

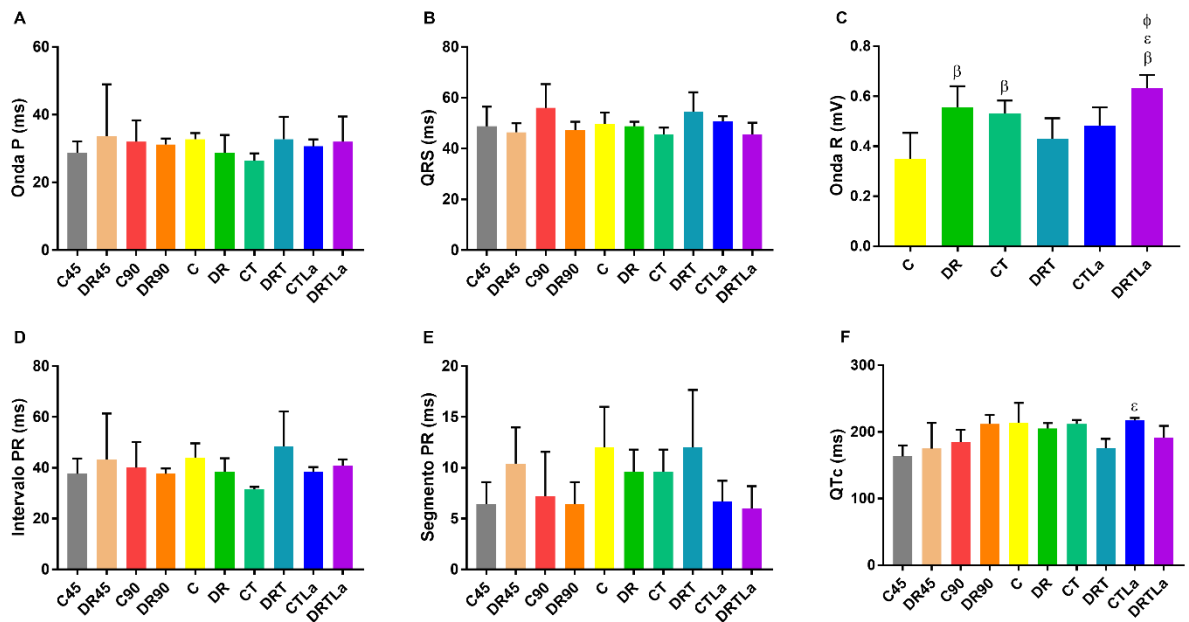


Figura 10 – A: Onda P do ECG. B: Complexo QRS. C: Pico de onda R. D: Intervalo PR. E: Segmento PR. F: Intervalo QT corrigido. Para todos os gráficos foi atribuído β para $p < 0,05$ em relação ao grupo C, ϵ para $p < 0,05$ em relação ao grupo DRT, ϕ para $p < 0,05$ em relação ao grupo CTL_a.

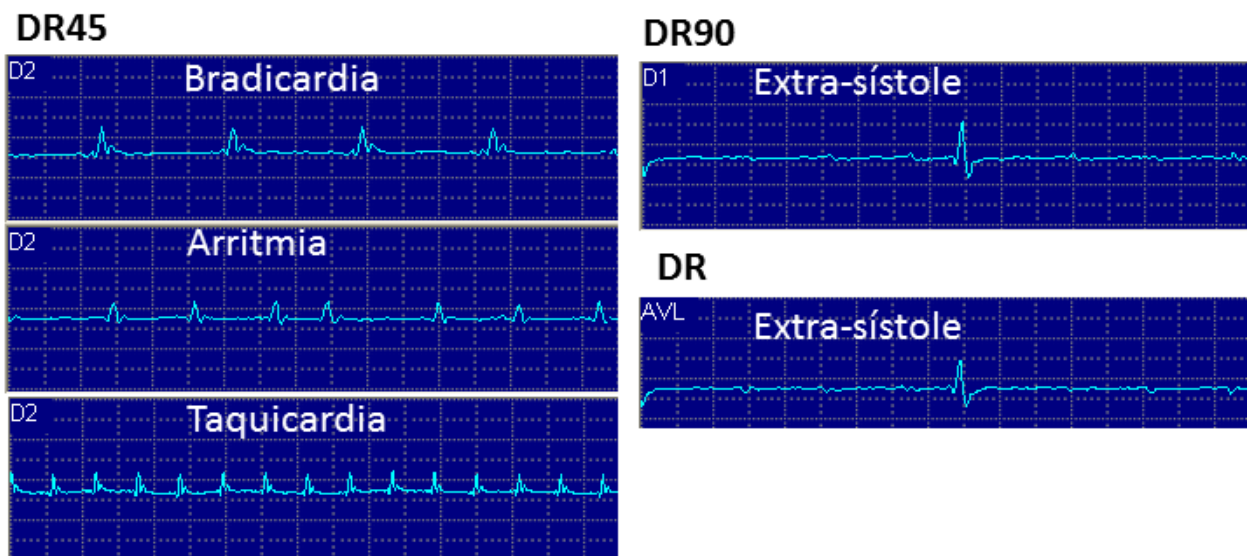


Figura 11 – Alterações da condução cardíaca encontrada nos grupos DR45, DR90 e DR, nas derivações DII, DI e AVL.

DISCUSSÃO

Diversos artigos apontam que a desnutrição proteica, acarreta em menor massa corporal, assim como menor altura, tanto nos estágios iniciais quanto ao decorrer do crescimento corpóreo, mesmo que o animal obtenha fontes de proteína adequada (REIS et al., 1997), sendo que nos primeiros 45 dias de experimento isso se tornou alarmante, uma vez que houve diferença em relação aos animais que consumiram dieta normoproteica. Notoriamente, no dia 90 em diante do experimento, não houve mais diferenças estatísticas, visto que esses animais não desenvolveram uma altura adequada, assim como a massa, porém ficaram com o IMC dentro da normalidade. Outros artigos mostram que há uma diminuição instalada da massa corporal em relação aos animais que não passaram por esse tipo de dieta, caracterizando o quadro de desnutrição proteica (PEZOLATO et al., 2015; JERONIMO et al., 2016; PERTILLE et al., 2016; LOPES et al., 2017).

No que diz respeito ao índice de massa do coração, a qual se apresenta maior no grupo DR45, a desnutrição proteica está associada com a perda muscular, perda de massa óssea e gordurosa, porém há um aumento da taxa metabólica basal (AMARE; HAMZA; ASEFA, 2015), isto pode estar associado com quadros de baixa quantidade de albumina sérica, elevando os níveis de nitrogênio uréico sérico e proteína C-reativa, condição, a qual, pode levar a uma parada cardíaca (HORWICH et al., 2008), esta situação pode gerar essa falha cardíaca pelo mal funcionamento do ventrículo esquerdo (FLOREA et al., 2004), desta maneira, essa sobrecarga contínua, juntamente com um baixo peso pode levar ao aumento do índice do coração.

Sabe-se que a funcionalidade pulmonar é limitada em indivíduos com desnutrição proteica quando é realizado testes do volume expiratório forçado e da capacidade vital forçada (LELIJVELD et al., 2017), ainda mais que sua formação, nas fases iniciais do desenvolvimento, compromete as fibras de elastina e de colágeno, necessárias para criar os alvéolos, muitas vezes, fazendo o pulmão apresentar menor massa (GAULTIER, 1991), desta maneira, os animais do grupos DR45, estavam com sua massa corporal muito diminuída para apresentar o valor de índice da massa pulmonar maior que o grupo C45.

Sobre a condição da FC, tem sido destacada que a desnutrição proteica é a responsável por potencializar as condições de bradicardia, redução da ejeção cardíaca, hipotrofia cardíaca (MARTINS; CHIANCA; FERNANDES, 2011), como

visto nesta pesquisa, uma vez que as FC continuam baixas mesmo ao chegar no final da fase adulta (grupo DR), no entanto, ao ocorrer o treinamento físico associado a PBM, a FC sobe, uma vez que ao analisar a variabilidade da frequência cardíaca, frente ao treinamento associado a PBM, foi visto que essa irradiação foi capaz de aumentar os índices da alta frequência, demonstrando maior controle simpático (PAOLILLO et al., 2014). Ademais, os grupos que se submeteram a dieta normoproteica e foram treinados, apresentaram menores FC de repouso em relação ao grupo C, pois o exercício físico aeróbico é capaz de aumentar a modulação do sistema parassimpático, diminuir a rigidez arterial e gerar hipertrofia do ventrículo esquerdo (GOLDSMITH; BLOOMFIELD; ROSENWINKEL, 2000), somente o grupo CTLa obteve maiores FC devido a irradiação do laser e aumento da modulação simpática (PAOLILLO et al., 2014).

Sobre os níveis de colesterol total, é sabido que a atividade física aeróbica influencia diretamente os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), sendo que o tempo da atividade está diretamente relacionada ao aumento, sendo preconizado, 23-74 minutos de exercício corrido para ter aumento significativo (KODAMA et al., 2007), justificando os valores dos grupos que passaram pelo treinamento periodizado serem semelhantes aos grupos C e DR, exceto o CT, que pode ter se beneficiado do aumento do HDL e também do aumento da lipase lipoprotéica, a qual pode diminuir os níveis sérios dos triglicerídeos e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (GRANDJEAN; CROUSE; ROHACK, 2000).

Em relação aos triglicerídeos, o nível se encontra baixo em casos de desnutrição, já que o funcionamento do fígado é restrito (IBRAHIM et al., 1994), como visto no grupo DR45 em relação ao C45 e o DR em relação ao DRT, porém o exercício físico aeróbico, associado ou não com a PBM, parece não ter influenciado significativamente nos níveis séricos.

Sobre o eletrocardiograma, este estudo é pioneiro em acompanhar a evolução cardíaca ao longo da desnutrição proteica e recuperação nutricional, desta maneira, ao analisar as ondas do ECG isoladamente, foi visto um aumento da amplitude da onda R dos grupos DR, CT e DRTL a ao se comparar com o controle, visto que esta onda representa o pico da contração ventricular na derivação DII, que, juntamente como aumento da onda QRS, poderiam justificar hipertrofia do ventrículo esquerdo (PÉRONNET et al., 1980), a qual não possível confirmar no presente estudo, sendo está uma limitação da pesquisa.

No entanto, é visto sinais de arritmia, bradicardia, taquicardia e extra-sístoles enquanto os animais não fizeram uma recuperação nutricional, sendo justificada pelo aumento metabólico basal, hipotrófica cardíaca e modulações parassimpáticas que podem ocorrer na desnutrição (DROTT; LUNDHOLM, 1992; FAGARD, 2003; MARTINS; CHIANCA; FERNANDES, 2011), porém o exercício físico aeróbico é capaz de aumento a força de injeção de sangue nos tecidos, melhorando a oxidação celular, de gerar um aumento da atividade parassimpática, realizando alterações no sistema de condução elétrica cardíaca, oferecendo o suporte necessário para eliminar as condições negativas impostas pela desnutrição proteica, a qual se alongou até o grupo DR e foram eliminadas nos grupos treinados (GARRETT; KIRKENDALL, 2000; FAGARD, 2003). Ainda, por mais que o PBM possa modular o sistema simpático, não acarretou em alterações nos registros de ECG.

CONCLUSÃO

A limitação da ingesta de aminoácidos nas fases iniciais do desenvolvimento pode acarretar em alterações nos índices de massa cardíaca e pulmonar, assim como gerar quadros deletérios para o coração, sendo que essas sequelas cardíacas, mesmo que haja uma recuperação nutricional, podem se pendurar até o estágio final de crescimento corpóreo, no entanto, elas são completamente extintas, quando é aplicado um programa de treinamento físico periodizado de longa duração, sendo que a PBM pode auxiliar a modular o sistema simpático, aumentando a frequência cardíaca, levando-a para um nível de normalidade.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABALAN, F. et al. Paradoxical effect of severe dietary restriction on Long-Evans rat life span. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 80, n. 6, p. 386–393, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792819>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

ADABBO, M. et al. Effects of Low-Level Laser Therapy Applied Before Treadmill Training on Recovery of Injured Skeletal Muscle in Wistar Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 34, n. 5, p. 1–7, 2016.

AMARE, H.; HAMZA, L.; ASEFA, H. Malnutrition and associated factors among heart failure patients on follow up at Jimma university specialized hospital, Ethiopia. **BMC cardiovascular disorders**, v. 15, p. 128, 15 out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26471898>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

ASSIS, L. et al. Effect of low-level laser therapy (808 nm) on skeletal muscle after endurance exercise training in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 19, n. 6, p. 457–465, 2015.

BLÖSSNER, M. et al. Malnutrition Quantifying the health impact at national and local levels World Health Organization Nutrition for Health and Development Protection of the Human Environment Geneva. **WHO Library Cataloguing-in-Publication**. 2005. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43120/9241591870.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

BRITO VIEIRA, W. H. et al. Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 74, n. 2, p. 444–9, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25166329>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

DE BRITO VIEIRA, W. H. et al. 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 in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 497–504, 26 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21870127>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

DE MARCHI, T. et al. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 231–236, 8 jan. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10103-011-0955-5>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

DROTT, C.; LUNDHOLM, K. Cardiac effects of caloric restriction-mechanisms and potential hazards. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 16, n. 7, p. 481–6, jul. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1323544>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

EKSTEROWICZ, J.; NAPIERAŁA, M.; ŻUKOW, walery. How tHe Kenyan runner's body structure affects sports results. **Human Movement**, v. 17, n. 1, p. 8–14, 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/humo.2016.17.issue-1/humo-2016-0002/humo-2016-0002.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

EL-SAYED, H. L. et al. Structural and functional affection of the heart in protein energy malnutrition patients on admission and after nutritional recovery. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 502–510, 30 abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319835>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

FAGARD, R. Athlete's heart. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 89, n. 12, p. 1455–61, 1 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617564>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

FERRARESI, C. et al. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 9, p. 740–754, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378263>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

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 in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 267–286, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/plm.2012.1.issue-4/plm-2012-0032/plm-2012-0032.xml>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

FERRARESI, C.; OLIVEIRA, T. D. B.; ZAFALON, L. D. O. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. p. 349–358, 2011.

FERREIRA, J. C. et al. MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING MICE: EFFECT OF EXERCISE TRAINING. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, ago. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

FLOREA, V. G. et al. Wasting of the left ventricle in patients with cardiac cachexia: a cardiovascular magnetic resonance study. **International Journal of Cardiology**, v. 97, n. 1, p. 15–20, out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336800>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

GARRETT, W. E.; KIRKENDALL, D. T. **Exercise and sport science**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GAULTIER, C. Malnutrition and lung growth. **Pediatric Pulmonology**, v. 10, n. 4, p. 278–286, 1 jan. 1991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ppul.1950100410>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

GOLDSMITH, R. L.; BLOOMFIELD, D. M.; ROSENWINKEL, E. T. Exercise and autonomic function. **Coronary artery disease**, v. 11, n. 2, p. 129–35, mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758814>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

GRANDJEAN, P. W.; CROUSE, S. F.; ROHACK, J. J. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 2, p. 472–480, ago. 2000. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/jappl.2000.89.2.472>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

HORWICH, T. B. et al. Albumin levels predict survival in patients with systolic heart failure. **American Heart Journal**, v. 155, n. 5, p. 883–889, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440336>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

IBRAHIM, S. A. et al. Correlation of some biochemical parameters with clinical features of protein energy malnutrition. **East African medical journal**, v. 71, n. 2, p. 77–83, fev. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925048>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

JERONIMO, L. C. et al. Morphological and Morphometric Study of the Muscle Fibers and Neuromuscular Junctions of the Extensor Digitorum Longus in Aged Rats Submitted to Maternal Protein Restriction. **International Journal of Morphology**, v. 34, n. 1, p. 396–403, mar. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022016000100057&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 8 dez. 2018.

KODAMA, S. et al. Effect of Aerobic Exercise Training on Serum Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, n. 10, p. 999, 28 maio 2007. Disponível em: <<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.167.10.999>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

LELIJVELD, N. et al. Long-term effects of severe acute malnutrition on lung function in Malawian children: a cohort study. **The European respiratory journal**, v. 49, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381429>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

LOPES, T. de S. et al. Protein Malnutrition Pre- and Postnatal and Nutritional Rehabilitation Modulates the Morphology of Muscle Fibers in Wistar Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, n. 3, p. 278–287, 4 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558017>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

MARTINS, C. D.; CHIANCA, D. A.; FERNANDES, L. G. Cardiac autonomic balance in rats submitted to protein restriction after weaning. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 2, p. 89–93, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143492>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, 23 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234057>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

NUNES, M. L. et al. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 1, p. 39–44, fev. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572002000100009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 21 jan. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Levels & Trends in Child Mortality. **World Health Organization**, 2018. Disponível em: <<https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2018/09/UN-IGME-Child-Mortality-Report-2018.pdf>>.

PAOLILLO, F. R. et al. Low-level laser therapy associated with high intensity resistance training on cardiac autonomic control of heart rate and skeletal muscle remodeling in wistar rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, n. 10, p. 796–803, dez. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/lsm.22298>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

PERTILLE, A. et al. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 83–91, 4 jul. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-

69842017000100083&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 8 dez. 2018.

PEZOLATO, V. A. et al. PERFIL HEMATOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS A DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL. **Biomotriz**, v. 9, n. 2, 13 dez. 2015. Disponível em: <<http://revistaelectronica.unicruz.edu.br/index.php/BIOMOTRIZ/article/view/1996>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

PÉRONNET, F. et al. Electro- and echocardiographic study of the left ventricle in man after training. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 45, n. 2–3, p. 125–130, dez. 1980. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00421320>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

REIS, M. A. B. et al. Glucose-Induced Insulin Secretion Is Impaired and Insulin-Induced Phosphorylation of the Insulin Receptor and Insulin Receptor Substrate-1 Are Increased in Protein-Deficient Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 3, p. 403–410, 1 mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082023>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

RODRIGUES, L. D. et al. **Manual de Cuidados e Procedimento com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. 1. ed. [s.l: s.n.]

SILVERMAN, J. A. et al. The effects of malnutrition on cardiac function in African children. **Arch Dis Child**, v.101, n. 2, p. 166-171. 2016. [s.d.]Disponível em: <<http://adc.bmj.com/>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

SIMIYU NJORORAI, W. W. Global inequality and athlete labour migration from Kenya. **Leisure/Loisir**, v. 34, n. 4, p. 443–461, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14927713.2010.543502>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 246–264, 12 set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504762>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

SIU, P. M. et al. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 2,

p. 555–560, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531911>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

XI, P. et al. Regulation of protein metabolism by glutamine: implications for nutrition and health. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 578–97, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196190>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

ZAGATTO, A. M. et al. Effects of low-level laser therapy on performance , inflammatory markers , and muscle damage in young water polo athletes : a double-blind , randomized , placebo-controlled study. *Lasers in Medical Science*, v. 31, n. 3, p. 511–521, 2016.

TERCEIRA PARTE

CONSIDERAÇÕES FINAIS

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

PERPECTIVAS FUTURAS

ANEXOS

5. Considerações Finais

5.Considerações Finais

Com base nas condições experimentais que compõe a presente tese, com destaque para os resultados expostos, é possível apresentar as seguintes considerações:

- A desnutrição proteica pode acarretar em diversos déficits nas estruturas biológicas, como alteração no perfil elétrico cardíaco, menor deformidade, elasticidade e resistência a tração muscular, níveis de glicogênio muscular e hepático inferiores e menor massa corporal e altura física.
- A recuperação nutricional é capaz de reverter alguns dos problemas gerados pela desnutrição proteica, como o perfil sanguíneo e metabólico, porém, no que diz a respeito da massa e altura corporal, isso não foi possível.
- A própria desnutrição proteica seguida de recuperação nutricional, parece afetar o perfil metabólico, melhorando o glicogênio muscular das fibras vermelhas e do fígado, melhorando o desempenho físico de longa duração, sendo que isso pode ser elevado caso haja PBM.
- A PBM, tanto no perfil de desnutrição e recuperação nutricional, quanto em um ambiente que os animais ingeriram uma ração imitando as dietas normais, foi efetiva para melhorar a concentração de glicogênio, melhorar a máxima fase estável de lactato e melhorar a resistência a fadiga.
- Esse estudo definiu uma nova fase estável de lactato para animais desnutridos e recuperados, além de colaborar com outros estudos de exercícios aeróbico na esteira ergométrica.
- O teste de tração muscular, relatou que a PBM pode auxiliar no ganho de deformação e resistência muscular, tanto em uma condição normal, quanto em uma condição de desnutrição e recuperação nutricional.
- A lesão muscular ocasionada por uma criolesão, parece ser mais rapidamente reabilitada, quando se associa PBM no treinamento físico,

sendo uma semana, o tempo suficiente para não ter prejuízo na performance.

6. Limitações do Estudo

6. Limitações do Estudo

O Estudo I, responsável por avaliar o perfil metabólico, da máxima fase estável de lactato e da performance aeróbica, tanto na condição de desnutrição e recuperação proteica, quanto em um ambiente com uma dieta normoproteica, poderia ter investigado outros aspectos metabólicos, os quais responderiam questões mais profundas sobre a manutenção energética. Assim, se tratando em esclarecer as vias envolvidas na relação síntese/degradação proteica, poderiam ser analisadas as proteínas-chave da via mTOR, como RAG A GTPase, PKB/Akt, mTOR, P70s6k1, IRS-1, desta maneira definiríamos com as vias de sinalização de insulina estão agindo.

No Estudo II, visto que foi avaliado a regeneração muscular após uma criolesão, observando se seria possível recuperar essa lesão mais rapidamente utilizando ao PBM para que não haja diminuição da performance, além de avaliar a condição muscular frente a um teste de tração mecânica. Seria interessante um estudo histológico para ver o alinhamento muscular, assim como o comportamento dos fibroblastos, relatando a quantidade de colágeno e elastina que foi depositado no período após a lesão. Ainda, quantificar os marcadores séricos inflamatórios, como IL-6, IL-10 e TNF-alfa.

No Estudo III, foi avaliado a condição elétrica do coração frente a desnutrição proteica e recuperação nutricional, visto que houve alterações significativas, as quais foram sanadas ao introduzir o exercício físico aeróbico, porém, uma análise mais apurada dos tipos de colesterol, além dos hormônios relacionados ao desempenho cardíaco, como o próprio cortisol e testosterona, deveriam ser investigados.

Vale ressaltar que durante o desenvolvimento da presente tese, a conjuntura econômica do país exigiu adequações orçamentárias diante a falta de fomento para

análises

mais

primorosas.

Ainda, por mais que haja milhares de indivíduos passando pelo processo de desnutrição, sendo que uma porcentagem consegue ter uma recuperação nutricional, no que diz respeito sobre as alterações biológicas relacionadas a atividade física, há uma escuridão nas pesquisas clínicas e experimentais, enaltecendo a importância desta tese, visto que ela pode influenciar novas condutas terapêuticas e abrir novos caminhos e oportunidades para estudos de relevância para a comunidade da área da saúde.

7. Perspectivas Futuras

7. Perspectivas futuras

Visto os resultados apurados, é viável partir para pesquisas clínicas, observando a recuperação de uma lesão muscular, juntamente com a PBM no tecido muscular, não somente para diminuir o processo inflamatório, mas sim não diminuir a performance física e melhorar as reservas de glicogênio, aumentar a circulação local, diminuindo, assim, o tempo de recuperação.

Ainda, observar a diferença da irradiação do laser de baixa intensidade em indivíduos que tenham passado por desnutrição proteica e recuperação nutricional para comparar os resultados de performance, com indivíduos que não tenham passado.

Por fim, é esperado que essa tese auxilie nas diversas hipóteses que tentam justificar por que os indivíduos africanos têm melhor condição física para fazerem exercícios aeróbicos de longa duração.

Anexo I

CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO I



Vitor Pezolato <vitor.pezolato@gmail.com>

Lasers in Medical Science - Submission Notification to co-author

1 mensagem

Lasers in Medical Science <em@editorialmanager.com>

12 de janeiro de 2019 11:53

Responder a: Lasers in Medical Science <josephinedenise.elmedo@springernature.com>

Para: Vitor Alexandre Pezolato <vitor.pezolato@gmail.com>

Re: "Physical and Metabolic Responses of Rats that have gone through Malnutrition and Protein Recovery in Relation to Aerobic Exercise with and without Photobiomodulation"
Full author list: Vitor Alexandre Pezolato; Rodrigo Dias; Ana Laura Martins de Andrade; Rafael Henrique Staiger; Francielly Stefani Ramos; Carlos Alberto da Silva; Nivaldo Antonio Parizotto

Dear Msc Vitor Pezolato,

We have received the submission entitled: "Physical and Metabolic Responses of Rats that have gone through Malnutrition and Protein Recovery in Relation to Aerobic Exercise with and without Photobiomodulation" for possible publication in Lasers in Medical Science, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Msc Ana Laura Martins de Andrade who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Lasers in Medical Science

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please email our publication office, stating the journal name(s) and your email address(es): PublicationOfficeSPI@springernature.com

In compliance with data protection regulations, please contact the publication office if you would like to have your personal information removed from the database.

6. Anexo II

CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO II

Track your co-authored submission to Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

3 mensagens

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology <EvisSupport@elsevier.com> 21 de janeiro de 2019 23:03
Responder a: EvisSupport@elsevier.com
Para: vitor.pezolato@gmail.com

Dear Ms Pezolato,

Submission no: JPHOTOBIOL_2019_85

Submission title: Effects of photobiomodulation on muscle injury, associated with periodized aerobic training in malnourished and nutritionally recovered animals

Corresponding author: Ms Ana Laura Martins de Andrade

Listed co-author(s): Ms Vitor Alexandre Pezolato, Dr Nivaldo Parizotto, Mr Bruno Silva, Ms Marco Aurélio Serafim Bovino, Professor Rodrigo Dias, Dr Carlos Albert da Silva

Ms Martins de Andrade has submitted a manuscript to Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evis.com/profile/api/navigate/JPHOTOBIOL?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach10111344%23%2FJPHOTOBIOL%2Fsubmission%2FJPHOTOBIOL_2019_85&email=vitor.pezolato@gmail.com&firstName=Vitor+Alexandre&surname=Pezolato&country=Brazil&institution=Federal+University+of+S%C3%A3o+Carlos&title=Ms

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

6. Anexo III

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Para: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva e Prof. MSc. Vitor Alexandre Pezolato.

De: Comissão de Ética no Uso de Animais.

Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 04/16.

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba **APROVOU** o protocolo de pesquisa nº 04/16 intitulado "*Parâmetros morfofuncionais e desempenho de Ratos submetidos a desnutrição, recuperação Proteica e subsequente programa de treinamento Aeróbio associado a suplementação com composto apresentando adição de nucleotídeos*" analisado por esta comissão. Nesta data também foi **APROVADO** o adendo e inserção do estudo "Efeitos do laser associado ao exercício aeróbico na recuperação de ratos desnutridos e saudáveis nos aspectos biológicos e comportamentais", o qual apresentou a documentação necessária para análise, sendo autorizado o uso do mesmo número de protocolo.

Atenciosamente,



Profa. Patrícia Carla Paulino
Comissão de Ética no Uso de Animais

Apêndice – I

Estudo I - traduzido para língua inglesa e adaptado para publicação.

**Physical and Metabolic Responses of Rats that have gone through Malnutrition
and Protein Recovery in Relation to Aerobic Exercise with and without Laser
Therapy Association**

Submetido: “Lasers in Medical Science”, em 12 de Janeiro de 2019, sob a
referência LIMS-D-19-00022

Physical and Metabolic Responses of Rats that have gone through Malnutrition and Protein Recovery in Relation to Aerobic Exercise with and without Laser Therapy Association

Vitor Alexandre Pezolato¹, Rodrigo Dias, Ana Laura Martins de Andrade, Rafael Henrique Staiger, Francielly Stefani Ramos, Carlos Alberto da Silva, Nivaldo Antonio Parizotto

1. Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos zip code: 13565-905, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Malnutrition is defined as a condition in which the body is unbalanced and/or energy deficient. Experimental studies that evaluate the conditions of physical exercise in undernourished organisms have been highlighted in the literature with the objective of evaluating the impact of this condition on the protein recovery and exercise performance. This study aimed to evaluate the impact of malnutrition on aerobic physical exercise associated or not with Photobiomodulation (PBM), being this resource widely discussed in the literature about its effects on physical exercise. Sixty-three Wistar rats were divided into six groups, control (C), trained control (CT), trained and irradiated control by PBM (CTLa), Recovered malnourished (DR), recovered malnourished trained (DRT), malnourished recovered and irradiated by PBM (DRTL_a). An Ergometric treadmill was used for the trained groups and an infrared laser (780nm) for the irradiated groups. The evaluations were determination of physical performance, determination of lactate and glycogen concentration. For the physical performance it was observed that the irradiated groups presented superior results to the other groups and in relation to the lactate level the trained groups associated or not the PBM presented values higher than the others. In the evaluation of the hepatic glycogen, better results were observed for the groups that underwent the process of malnutrition trained with or without PBM. Thus, this study demonstrated that the deleterious effects of malnutrition may not interfere with physical performance in trained individuals and that the association of PBM with exercise is capable of improving the individual's resistance.

Keywords: malnutrition, exercise, photobiomodulation

INTRODUCTION

Malnutrition is defined as a condition in which the body is imbalanced and/or energy deficient in the recognized macro-nutrients such as proteins, carbohydrates and/or lipids and/or micro-nutrients[1]. This condition induces different magnitudes with regard to body mass and height, as well as delayed neuropsychosocial development[2] and other clinical alterations associated with energy deficiency[2–5]. Physical exercise concomitant with proper balanced protein intake, are considered as primary components for the optimization of muscle function throughout the aging process[5] and these conditions can be influenced by the negative influence of malnutrition.

Concerned about the high infant mortality rates due to malnutrition, recently demonstrated by the World Health Organization (WHO) [2], it has been praised in several studies with experimental animals that proteins are important constituents for cellular homeostasis, being that deficiency in ingestion and/or absorption through establishment of a malnutrition condition delineated in the early and critical stages of development potentially negatively modulates the functioning and/or development of the most varied tissues[2, 6–8].

Studies that have proposed a critical analysis on proteins recovery subsequent to a malnutrition condition delineated primarily in the early and critical stages of the development of the animals undergoes partial recovery of the most varied tissues [6, 7, 9–11]. Few studies have focused on the impact of physical exercise on acute modulations and/or chronic adaptations against these nutritional conditions, and, nevertheless, not inferring any analysis regarding the possible strategies related to laser photobiomodulation in association with exercise.

Photobiomodulation (PBM), also called low level laser therapy (LLLT), was used in clinical practice to improve muscular performance in relation to physical activity, with a decrease muscle damage markers like creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), besides stimulating the mitochondrial metabolism, mainly cytochrome C oxidase, demonstrating positive results in the improvement of muscle fatigue indexes and physical performance, mainly aerobic[12]. In this way, it is

possible that the PBM can aid in the metabolic recovery against protein malnutrition and nutritional recovery, also, improving the physical capacity.

When faced with the reality of aerobic exercise of long duration, such as marathons, it is apparent that the Kenyans or individuals in Africa have gained most of the evidence in recent years. There is evidence that body proportions, especially longer legs with lower fat percentage, racial differences, ability to perform a hip extension with lower oxygen consumption, higher concentrations of enzymes, which make lipoxidation and glycogen burning, directly influence the result[13].

Since most of the individuals in these countries go through the process of protein malnutrition and nutritional recovery[2], it is possible for this characteristic to change the metabolic pathways by altering the energy profile during aerobic exercises, opening new perspectives of research on the triad, malnutrition and protein recovery, aerobic physical exercise and strategies to increase performance via biophysical agents.

The aim of this study was to determine if protein malnutrition, followed by nutritional recovery, may lead to negative changes in performance during aerobic physical activity, as well as to measure if PBM is able to improve the metabolic profile, consequently, physical performance both in the condition of hypoproteic and normoproteic diets.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Animals:

Sixty-three Wistar rats (*Rathus norvegicus* var, *albinus*, Rodentia, Mamalia) were weaned on the 21st day of life from Anilab® (Paulínia, SP, Brazil). The animals were kept in the bioterro in collective cages containing 5 and 7 animals for the animals submitted to adequate protein nutritional condition and to the animals submitted to malnutrition/protein recovery condition, respectively.

In addition, the animals received water and feed *ad libitum* and were kept in an environment with controlled temperature of 23 ± 2 °C and adequate lighting, light/dark cycle of 12 hours, with light on after 6:00 hours. It should be pointed out that, with regard to cleaning the cages, the procedure was adopted was to transfer a small portion of the material from the dirty cage (shavings with faeces and urine) to the clean cage, followed by the addition of more clean shavings aiming at the

maintenance of olfactory marks and, consequently, the stability of the social hierarchy of the animals in each cage, reducing possible stress peaks [14].

Also, throughout the experimental period, the animals were continuously exposed in a systematic/organized way to different enriched environment conditions, considering previously published guidelines [14], in order to minimize the monotony of the confinement and provide greater possibility of natural interactions of the species with regard to environmental and social issues. Admittedly, the condition of enriched environment has the potential to minimize the level of stress and, consequently, increase the possibilities of obtaining more stable animals in relation to the physiological and psychological parameters [15], ensuring better scientific results.

The animals were treated according to the recommendations of the Guide for Care of Laboratory Animals (National Research Council, 1996), and the work was approved by the Animal Experimentation Commission of the Methodist University of Piracicaba (UNIMEP) under protocol number 04/16.

Experimental Groups

After the weaning period, the animals were randomly divided into 6 groups, containing 5-7 animals each, so-called: Control (C), Trained Control (CT), Trained and Irradiated Control (CTLa), Malnourished and Recovered Nutritionally (DR), Malnourished and Recovered Nutritionally and Trained (DRT), Malnourished and Recovered Nutritionally, Trained and Irradiated (DRTL_a).

Experimental Design

The groups C, CT, CTLa underwent the normoprotein diet (AN 93 M 14%) throughout the experiment and the DR, DRT, DRTL_a groups underwent a hypoproteic diet (AN 6%) for 45 days, causing the protein malnutrition and were recovered with a normoprotein diet for 45 days.

Upon reaching the 83rd day of the experiment, the groups underwent an adaptation protocol on the treadmill and, later, a physical training program, which starts on day 90 and lasts 36 days, except for groups C and DR.

Groups CTLa and DRL_a received low intensity laser irradiation after each training session. See Figure 1 for a better visualization of the experimental design.

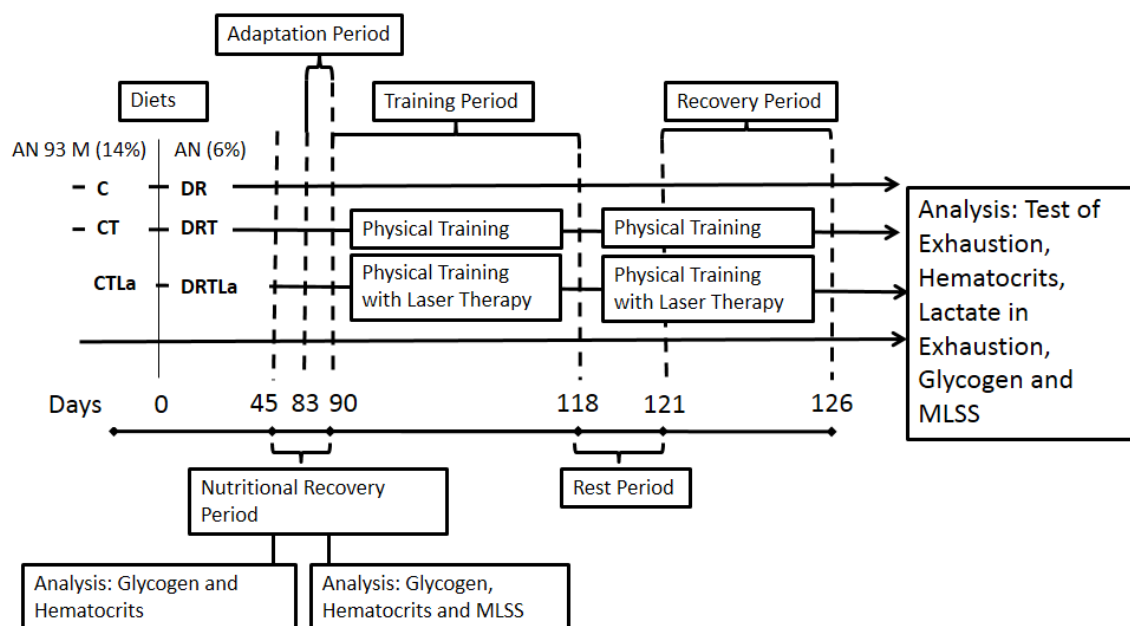


Figure 1 - Experimental design, following a time line (days) with the analyzes that were performed at each moment.

Malnutrition and Nutrition Recovery Protocol

The animals of groups C, CT and CTLa were fed an AIN 93 M normoprotein diet containing 14% protein, while the DR, DRT and DRTL a groups were fed an AN hipoprotein diet containing 6% protein for 45 days, food commercialized by PragSoluções Serviços e Comércio Ltda; CNPJ: 03,420,938 / 0001-59 / IE 401,091,476,112-ME. Subsequently, the animals went through the nutritional recovery process, being fed a normoprotein diet AIN 93 M, containing 14% protein for the period of 45 days. The compositions of said diets are previously described (Table 1).

Table 1- Composition of the diets (g / kg) used for malnutrition and nutritional recovery.

Diet AN 93 M -14% protein		Diet AN - 6% protein (malnutrition)	
Ingredients for 1 Kg	Grams	Ingredients for 1 Kg	Grams
Corn starch	465.700	Corn starch	508.000
Casein	140.000	Casein	66.000
Dextrinized Starch	155.000	Dextrinized Starch	166.500
Sucrose	100.000	Sucrose	121.000
Soybean Oil	40.000	Soybean Oil	40.000

Fiber	50.000	Fiber	50.000
L-cystine	1.800	L-cystine	1.000
Chloride Choline	2.500	Chloride Choline	2.500
Mineral Mix	35.000	Mineral Mix	35.000
Vitamin Mix	10.000	Vitamin Mix	10.000
TOTAL	1000.0	TOTAL	1000.0

Treadmill and Adaptation of Animals

In order to carry out the physical training programs, a treadmill of the brand Rebook TR2 Premierrun Treadmill® (Adidas do Brasil, Embú, SP, Brazil) was used, presenting 8 lanes, with speed marking in meters per minute (m/min^{-1}) and automatic tilt. The animals received training undergoing the adaptation on the treadmill in the last week of nutritional recovery representing by 83rd-90th day of experiment. The adaptation protocol consisted of placing the animals on the treadmill for one week, without inclination, with progressive increase of velocity until reaching $18 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ (mean value of the first week of training), with progressive increase of the running time until reaching 15 minutes.

Periodized Physical Training Program with Linear Polishing

The protocol of aerobic training was performed daily, from Monday to Friday, during 36 days, in the afternoon. This protocol presents periodization of volume and intensity obeying periods of active rest (Table 2).

This graduation intends to allow an adaptation of the animals to the training, thus advocating a predominance of aerobic training. Its intensity was calculated following the lactate levels found in the studies of Ferreira[16] and Brito Vieira[17] and in the test of Maximal Lactate Steady State (MLSS). The periodized physical training program with linear polishing was based on the book of Prestes [18].

Table 2 - Training protocol, showing the volume (training duration) in minutes (min), Intensity in meters per minute (m.min⁻¹) and training load (u.a) over the days.

Day	Volume (min)	Intensity (m.min ⁻¹)	Workout load (Volume x intensity = u.a)
1	20	16	320
2	30	17	510
3	40	18	720
4	45	19	855
5	50	20	1000
6	0	-	-
7	0	-	-
8	60	20	1200
9	60	20	1200
10	60	20	1200
11	60	20	1200
12	60	22	1320
13	0	-	-
14	0	-	-
15	60	22	1320
16	60	24	1440
17	60	22	1320
18	60	24	1440
19	60	22	1320
20	0	-	-
21	0	-	-
22	60	24	1440
23	60	24	1440
24	60	24	1440
25	60	24	1440

26	60	24	1440
27	0	-	-
28	0	-	-
29	0	-	-
30	50	24	1200
31	40	24	960
32	35	24	840
33	30	24	720
34	25	24	600
35	0	-	-
36	0	-	-

The beginning of the training was carried out with a lower workload (10% of predetermined speed and time for the day) as a form of heating, as previously recommended[19].

Photobiomodulation

We used a low-intensity laser GaAlAs (MM Optics, San Carlos, SP, Brazil), which is calibrated and measured prior to the experimental procedure, the following study parameters Vieira Brito[20] (Table 3).

The irradiation was performed in a punctual way, in the muscle belly of the anterior tibial and triceps sural immediately after the sessions of physical exercises aimed to enjoy the conditions of "physical stress" and metabolic changes, given more effective under these features[21].

All animals were trichotomized in the region where they received the irradiations, and during the application, a cotton blanket was used to contain the animal.

Table 3 - GaAlAs laser parameters used:

Parameters	Values
Power (mW)	70

Wavelength (nm)	780
Mode of Action	Continuous
Beam transverse area (cm ²)	0.04
Energy Density (J/cm ²)	214
Time (s)	122
Energy (J)	8,54

Determination of Body Weight

Weekly, the animals were weighed through the digital scale (Indústria Filizola, São Paulo, SP, Brazil).

Determination of Physical Performance

For the determination of the physical performance, it was initially evaluated from the perspective of the MLSS, following the parameters of Ferreira [16] and Brito Vieira [17] via lactate kinetics at a specific stress load. For this, the animals performed physical exercise on the treadmill at intensity of 20 m/min⁻¹, and exhaustion was defined as the point where the animals were unable to continue the continuous course for 1 minute [22]. At the end of the exhaustion test the blood lactate concentration was measured.

Determination of Lactate and Hematocyte Circulating Concentration

To determine the circulating concentration of lactate, a cut was made at the distal end of the tail of the animals, at about 2 mm at the end of it, and a tail massage was carried out from the anus to the tail end to puncture a drop of blood, which was collected to perform the MLSS and at the end of the exhaustion test, considering previously published guidelines [14]. A portable digital lactometer and its ribbons of the Roche brand (Produtos Roche Químico e Farmacêuticos, São Paulo, SP, Brazil) were used, with results expressed in mmol/L.

For the determination of the hematocrit, a Perfecta® heparinized capillary (Perfecta, São Paulo, SP, Brazil) was filled with approximately 75% of the total volume and centrifuged for 5 minutes in a Fanem 241® (Fanem, São Paulo, SP, Brazil), with the results were interpreted using the Fanem® hematocrit reading card (Fanem, São Paulo, SP, Brazil), the results being expressed as the relative portion (%) of the solid component of the blood compared to the plasma. This methodology was performed, following standard care and specifications[23].

Determination of Glycogen Content

To collect samples, the rats were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (Dopalen®) (Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínea, SP, Brazil), and xylazine hydrochloride (Rompun®) (Bayer SA, São Paulo, Brazil), intraperitoneally, considering previously published guidelines of 0.1mL.100g⁻¹ and 0.07mL.100g⁻¹, respectively[14]. With no pain stimuli being confirmed, the animals were decapitated and tissue removed, which were frozen in the biofreezer at -70°C.

To determine the glycogen content, after thawing of liver, heart muscle, diaphragm, soleus, gastrocnemius (white and red portion) and anterior tibial samples, the samples were subjected to 30% hot potassium hydroxide (KOH) digestion and the glycogen was precipitated from the passage through hot ethanol. Between one phase and another of the precipitation, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes, with the glycogen submitted to acid hydrolysis in the presence of phenol, considering previously published guidelines[24], being the results expressed in mg/100mg of wet tissue.

Statistical Analysis

The data collected were tabulated and later analyzed by the statistical software "GraphPad Prism 7". Statistical analysis was performed using the Shapiro-Wilk test to verify normality.

Parametric data were analyzed by one-way ANOVA, when it was the case, thow-way ANOVA, followed by the Tukey test, while non-parametric variables passed the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test. In all calculations a critical level of $p < 0.05$ was set for statistical significance.

RESULTS

Body Mass

	C vs. DR	C vs. CT	C vs. DRT	C vs. CTLa	C vs. DRTL	DR vs. CT	DR vs. DRT	DR vs. CTLa	DR vs. DRTL	CT vs. DRT	CT vs. CTLa	CT vs. DRTL	DRT vs. CTLa
0	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9
45	<0,0001	0,0013	<0,0001	0,9998	<0,0001	<0,0001	>0,9	<0,0001	>0,9	<0,0001	0,0034	<0,0001	<0,0001
90	<0,0001	0,6278	<0,0001	0,9622	<0,0001	<0,0001	0,9976	<0,0001	0,9636	<0,0001	0,9773	<0,0001	<0,0001
126	<0,0001	0,1265	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,6962	0,0065	0,9102	<0,0001	0,002	<0,0001	<0,0001

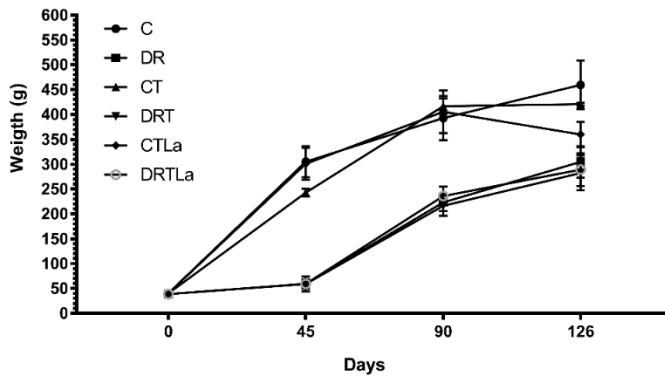


Figure 2 - Variation of body mass (grams) in relation to time (days), as well as the adjusted p value ($p < 0.05$).

When analyzing body mass, it was observed that there was a static difference between groups C, CT, CTLa in relation to DR, DRT and DRTL groups, from 45th day to 90th day, suggesting that malnutrition occurred during the first 45 days of experiment suggesting that malnutrition occurred during the first 45 days of the experiment and that even if these animals undergo nutritional recovery, the body mass is not completely recovered ($p < 0.05$, Figure 2), showing a difference of 44.71% between the average weight of the groups that went through malnutrition and nutritional recovery in relation to those that did not pass. Also, after physical training, associated or not with PBM, the groups that suffered from protein malnutrition did not match the groups that had normal nutrition, even though they increased their weight ($p < 0.05$; Figure 2). Finally, CTLa had lower body mass when compared to groups C and CT, demonstrating that PBM had a direct influence on the decrease of body mass when associated to exercise (-21% and 14%, respectively, $p < 0.05$; Figure 2).

MLSS

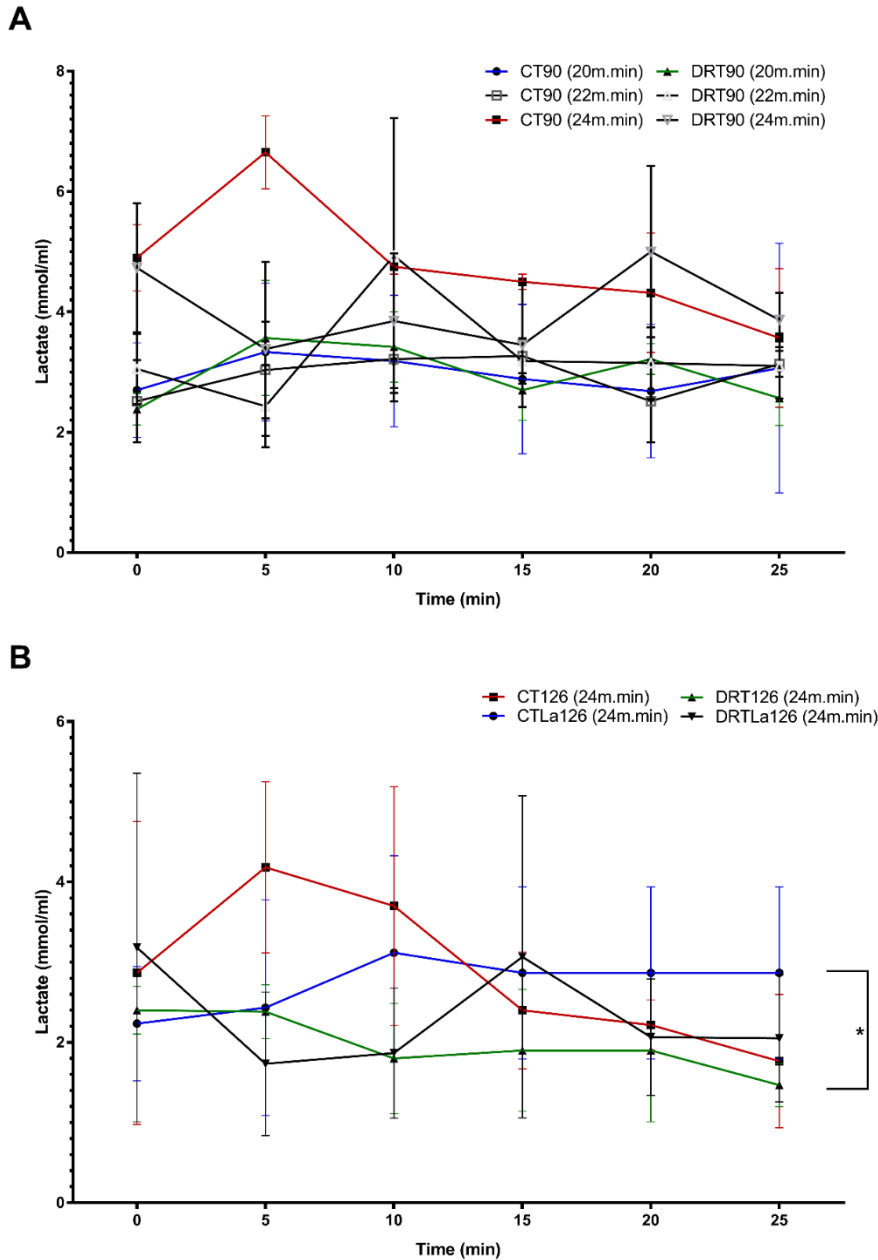


Figure 3 - MLSS, being figure 3-A on the 90th day of the experiment, investigating different velocities ($20\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $22\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $24\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) in in the groups that followed the protocol of malnutrition and nutritional recovery and in groups that did not. Figure 3-B, demonstrates the 126th day of experiment, investigating differences between groups that were trained and groups that were trained and irradiated with the same velocity ($24\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$), both in the normoprotein diet groups and in the groups with a hypoprotein diet. * Statistical difference between groups, $p < 0.05$.

Figure 3-A shows the expression of the blood lactate curves of the rats submitted to aerobic exercise on the treadmill after the adaptation phase. The MLSS test was done to acquire the correct value of the intensity that should start the periodic physical training of the animals, in this way was done three different speeds for the groups CT90 (trained control, represented by 90th day of experiment), and for the group DRT90 (malnourished and recovered nutritionally and trained, represented by

90th day of experiment), being: 20m.min⁻¹, 22m.min⁻¹, 24m.min⁻¹. At the end of the test there was no statistical difference between groups, yet it is close to 3.87 mmol/ml, as defined by Barro Machado[25], in order to predict that the exercise is aerobic.

In Figure 3-B, the MLSS was done to verify that at the end of the training period, the rats were still performing aerobic exercises and if serum lactate values decreased during the training period. Thus, no statistically significant difference ($p > 0.05$) was observed between groups CT90 (24m.min) and DRT90 (24m.min) in relation to groups that completed aerobic physical training, either with or without PBM (CT126, CTLa126, DRT126, DRTL126). There was only statistical difference ($p=0.0422$) between CTLa126 and DRTL126.

Hematocrit Serum Level:

The relative percentage of hematocrit in the blood had a significant difference only when comparing the animals from the DR, DRT and DRTL126 groups, which were at the end of the protein malnutrition process, represented by 45th day of the experiment, in relation to groups C, CT, CTLa ($p < 0.0001$), demonstrating that the hematocrit level is recovered during nutritional recovery and when performing aerobic physical activity, both with PBM and without, this level was not altered in any of the groups ($p > 0.05$), as seen in Figure 4-A.

Exhaustion Test and Level of Serum Lactate:

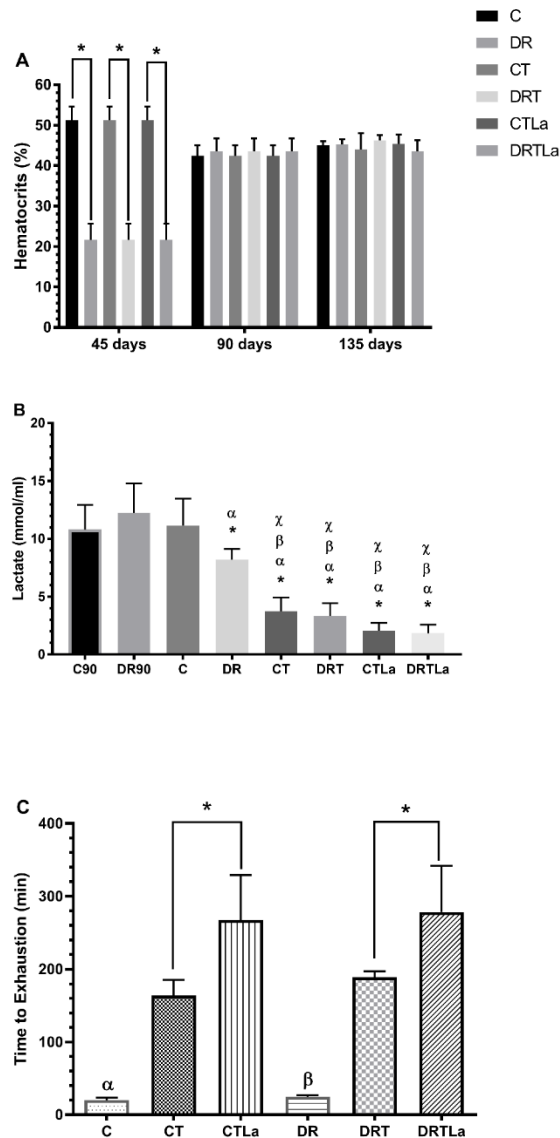


Figure 4 - First, Figure 4-A demonstrates the level of blood hematocrit (%), in the experimental moments (45th, 90th and 135th day), being * Statistical difference between groups, $p < 0.05$. Figure 4-B demonstrates the level of blood lactate (mmol/ml) at the end of the exhaustion test, in the different groups, being * $p < 0,05$ in relation to the C90, α $p < 0,05$ in relation to the C, χ $p < 0$, in relation to the DR. The test of exhaustion (min,) is seen in Figure 4-C, being * $p < 0,05$ between groups, α $p < 0,05$ in relation to the other groups less DR, β $p < 0,05$ in relation to the other groups less C.

In the exhaustion test (Figure 4-C), it was possible to quantify the performance of the animals in relation to the aerobic physical exercise, in this way it is clear that the sedentary groups C and DR had results with a significant difference in relation to the trained groups ($p < 0,0001$ in relation to CT, CTLa, DRT and DRTL), showing results of low aerobic performance (Figure 4-B). Regarding the lactate level at the end of the exhaustion test, it was high (above 3.87 mmol/ml) in groups C90, DR90,

C and DR, demonstrating that the exercise was not only aerobic. Although, in the exhaustion test there was no statistical difference between group C and DR, but the levels of lactate in DR group was lower (C vs DR, $p=0.0019$).

Furthermore, the exhaustion test (Figure 4-C) showed that the CT vs DRT groups showed no statistically significant difference ($p=0.963$), nor in the serum lactate level ($p>0.999$) (Figure 4-B), suggesting that malnutrition followed by nutritional recovery does not influence the results related to aerobic performance.

Finally, the CTLa and DRTLla groups demonstrate that irradiation may improve performance, since they presented statistically significant results in relation to the CT and DRT groups (CT vs CTLa; $p=0.0031$, with a 78.65% improvement and DRT vs DRTLla, $p=0.0154$, with improvement of 63.68%), in the exhaustion test (Figure 4-C). It is noteworthy that no significant difference was demonstrated when comparing the level of lactate of these groups (Figure 4-B).

Dosage of Glycogen

Table 4 – Muscle and Liver Glycogen represented in mg/100mg:

Groups	Heart	WG	RG	Soleus	Anterior Tibialis	Diaphragm	Liver
C45	0,34±0,09	0,22±0,19	0,33±0,7	0,57±0,25	0,50±0,19	0,28±0,12	3,35±0,71
DR45	0,12±0,01	0,17±0,08	0,15±0,01	0,13±0,02	0,15±0,01	0,1±0,01	0,92±0,09
C90	0,13±0,01	0,58±0,08	0,38±0,02	0,34±0,01	0,36±0,02	0,14±0,01	2,97±0,33
DR90	0,27±0,02	0,33±0,03	0,56±0,12	0,58±0,09	0,42±0,06	0,44±0,08	3,65±0,60
C	0,17±0,01	0,33±0,05	0,33±0,06	0,37±0,02	0,32±0,05	0,16±0,04	2,62±0,07
DR	0,24±0,03	0,43±0,04	0,34±0,03	0,46±0,05	0,38±0,03	0,25±0,02	2,96±0,73
CT	0,16±0,01	0,19±0,04	0,16±0,02	0,14±0,01	0,05±0,02	0,1±0,02	0,9±0,04
DRT	0,22±0,03	0,17±0,02	0,21±0,03	0,25±0,04	0,20±0,03	0,10±0,02	2,04±0,09
CTLa	0,18±0,02	0,3±0,01	0,39±0,01	0,38±0,03	0,39±0,05	0,26±0,09	1,3±0,14
DRTLla	0,24±0,03	0,27±0,02	0,41±0,04	0,41±0,04	0,41±0,03	0,28±0,09	2,51±0,20

Data are means (\pm SD), and all p values are in Appedix I. White Gastrocnemius (WG), Red Gastrointestinal (RG), Anterior Tibialis (TA).

Initially, myocardial glycogen (Table 4) was low in DR45 compared to C45 ($p=0.0008$), demonstrating that protein malnutrition causes deleterious effects on

cardiac metabolism. However, nutritional recovery was performed and there was no difference between groups C90, DR90, C and DR ($p > 0.05$).

There was no statistically significant difference in heart glycogen between groups C, CT, CTLa, DR, DRT and DRTL_a (Table 4).

In relation to the gastrocnemius muscle (white and red portion), tibialis anterior, soleus and diaphragm, it was observed that the values were low and statistically significant ($p < 0.05$) when compared DR45 with C45. At the end of the nutritional recovery, given by 90th day of the experiment, it was possible to analyze that there was no recovery of glycogen in WG, Soleus and diaphragm muscles when comparing DR90 with C90 ($p < 0.05$), unlike the RG and tibialis anterior muscles ($p > 0.05$) (Table 4).

For the other comparisons, as there are many data, they were separated into topics.

White Gastrocnemius: The analysis was statistically different between the groups: C vs DRT ($p=0,0046$), DR vs CT ($p=0,0002$) e DR vs DRT ($p < 0,0001$) (Table 4).

Red Gastrocnemius: The analysis was statistically different between the groups: C vs CT ($p=0,0005$), C vs DRT ($p=0,0222$), DR vs CT ($p=0,0111$), CT vs CTL_a ($p=0,0001$), CT vs DRTL_a ($p < 0,0001$), DRT vs CTL_a ($p=0,0084$) e DRT vs DRTL_a ($p=0,0006$) (Table 4).

Soleus: The analysis was statistically different between the groups: C vs CT ($p < 0,0001$), DR vs CT ($p < 0,0001$), DR vs DRT ($p=0,0013$), CT vs CTL_a ($p < 0,0001$), CT vs DRTL_a ($p < 0,0001$) e DRT vs DRTL_a ($p=0,0474$) (Table 4).

Tibialis anterior: The analysis was statistically different between the groups: C vs CT ($p < 0,0001$), C vs DRT ($p=0,0252$), DR vs CT ($p < 0,0001$), DR vs DRT ($p=0,0025$), CT vs CTL_a ($p < 0,0001$), CT vs DRTL_a ($p < 0,0001$), DRT vs CTL_a ($p=0,0018$) e DRT vs DRTL_a ($p=0,0002$) (Table 4).

Diaphragm: The analysis was statistically different between the groups: DR vs CT ($p=0,253$), CT vs CTL_a ($p=0,0006$), CT vs DRTL_a ($p=0,0002$), DRT vs CTL_a ($p=0,0054$) e DRT vs DRTL_a ($p=0,0025$) (Table 4).

During the analysis of hepatic glycogen, it was evident that there was a decrease in the reserve of DR45 vs C45 ($p < 0.0001$), however, after nutritional recovery, hepatic glycogen values were maintained between groups C90 vs DR90 ($p > 0.05$). At the end of the physical training program, a new analysis was performed,

which showed that the DRT and DRTL_a groups had greater reserves when compared to the CT and CTL_a groups, 126.6% (p=0.01) and 93.07% (p=0.0119) respectively (Table 4).

DISCUSSION

Regarding the evolution of body mass, the results showed that the model of protein malnutrition, when applied in the early and critical stages of development, in this case was in the first 45 days of the experiment, presented potential to modulate the development of weight, since the animals had lower values. These results are due to the low availability of amino acids [26], confirming the potential of this diet for induction of protein malnutrition in the DR, DRT and DRTL_a groups, even though the difference is greater than 40% of body mass, this decrease characterizes a third degree malnutrition in humans [27].

The results of the present study, regarding the evolution of the mass, corroborate with the findings of several studies [6, 7, 10, 11] demonstrating the importance of protein ingestion for the optimal evolution of body mass in the early stages and development.

In the next step, when the protein recovery started, it was observed that there was a partial evolution of the body mass, since when the animals arrived at the end of the adult phase, there was still a statistical difference between all the groups that went through the protein malnutrition, in relation to the groups that did a normoprotein diet, confirming the potential of the protocol for induction of protein malnutrition, still generating associated structural changes, possibly permanently [26, 28].

Interestingly, the CTRL_a group had lower body mass when compared to groups C and CT, demonstrating that exercise-associated PBM may decrease body fat, since red and infrared laser photons can be absorbed by cytochrome C oxidase, leading to an increase in mitochondrial membrane potential, increasing oxygen consumption, adenosine triphosphate (ATP), transient increase of reactive oxygen species (ROS) and releasing nitric oxide (NO) [29, 30]. This may occur in adipose cell mitochondria. In response to these factors, increases in levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), which activates protein kinase (PKA), phosphorylating hormone sensitive lipase (HSL), an enzyme that will convert the triglyceride to glycerol and fatty acids, which can be used in beta-oxidation [29–31].

The MSLL is one of the best tests to mark the aerobic endurance capacity [32]. The importance of MSLL is to define exercise intensity, since if there is lactate accumulation, glycolysis may exceed the demand for pyruvate in mitochondrial respiration, so we can define whether physical exercise is using aerobic or anerobic energy sources[16]. The test was used to ascertain the intensity of the periodized training program, as shown in Figure-3A, as there was no statistical difference and the values were below 4 mmol/ml[25], the exercise was characterized as aerobic and the intensity reached was $24\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, both for the group that went through a normoprotein diet, and for the group that went through malnutrition and nutritional recovery. Thus, the study is pioneer in defining MSLL in malnourished and recovered animals in treadmill.

Our research collaborates with Pezolato [11], since hematocrit levels were significantly lower in the DR45 than in C45, demonstrating that the lack of amino acids can generate a deficiency in the blood profile, which was recovered when the animals did a normoprotein diet. Furthermore, aerobic exercise can alter the concentration of these cells, which is correlated with physical performance in long-term exercises, and its increase is influenced by the reduction of plasma volume[33, 34]. Our periodic training design, did not occur its decrease, seen in other programs of aerobic training [33], moreover, the PBM showed no increase hematocrit levels, so this is not the way to justify the increased physical performance in the exhaust test when comparing the group DRT with DRTL_a, and the CT with CTL_a.

The increase in the aerobic physical performance of the irradiated groups corroborates with several studies[12, 21, 35–38], but this is a pioneer in investigating the effects of PBM in malnourished and nutritionally recovered rats, since this information is important, since most of the runners are from countries that have a very high level of child malnutrition[13]. In this way, the oxidative metabolic profile of the DRTL_a group had no impairments affecting its performance, since there was no difference in relation to the CTL_a group, both in the exhaustion test and in the serum lactate level.

Myocardial glycogen seems to suffer from the effects of protein malnutrition, however, it is a tissue of possible recovery, since its levels returned to normal, after nutritional recovery, as already seen in electrocardiographic and blood

tissue analyzes[8, 11]. Also, this organ maintains the same level of glycogen, even though it has groups that did aerobic physical activity, being irradiated or not.

Although aerobic exercise increases the expression of AKT, AKT phosphorylation and Glycogen synthase Kinase-3 β phosphorylation in the myocardium [39], these reserves are not elevated, since the continuous use of the muscle, even during aerobic physical activity, should balance the glycogen reserves, demonstrating that this is an extremely versatile tissue.

Regarding muscle glycogen, it is seen that protein malnutrition leaves this low concentration, which was recovered, except in the diaphragm, white gastrocnemius and soleus muscles. Decreased muscle glycogen in the diaphragm is seen when there is nutrient deprivation[40], now, the white fibers of the gastrocnemius, present less reserves, possibly, because malnutrition helps in the creation of oxidative metabolic background, and the first muscle tissue to undergo catabolism in malnutrition are glycolytic fibers[41, 42].

The results of the increased performance of the irradiated groups (CTLa and DRTL_a), prove to be real, since the levels of muscle glycogen, tandem of the red gastrocnemius, and in the soleus, predominantly red muscles, are superior when compared to the CT and DRT groups, thus allowing an improvement in fatigue resistance, showing that the low level laser can act directly on insulin signaling, possibly increasing the glycogen phosphorylating enzymes, which was a limitation of the present study non-dosage.

Furthermore, CT and DRT have lower concentrations of muscle glycogen WG, RG and Soleus than groups C and DR, although aerobic exercise increases the expression of AKT, AKT phosphorylation and Glycogen synthase Kinase-3 β phosphorylation[39], thus justifying the result due to the short rest period, 3 days, that the animals had after performing the exhaustion test, not recovering the glycogen completely, once again extolling the importance of the PBM in the aerobic physical exercise, demonstrating an improvement of the muscular glycogen recovery, since there was no statistical difference between the groups DRTL_a, CTL_a with groups C and DR, again, justifying the results of improvement of the performance of the irradiated groups in relation to the groups that were not irradiated.

CONCLUSION

It is possible that the deleterious effects caused by protein malnutrition do not affect the physical performance during an aerobic exercise, since in the course of nutritional recovery, most of the analyzed characteristics were normalized, mainly by the increase of the glycogen of the red muscles and the liver, which may be an adaptive condition, which justifies the same physical performance among the groups that have gone through the malnutrition and protein recovery protocol, and those who did not pass. Still, the PBM can increase muscle glycogen reserves, enabling increased resistance to fatigue, promoting improvement in sporting results, as seen in the exhaustion test, in this way, biophysical resources should be implemented in physical training programs.

Finally, MSLM was traced to animals that underwent malnutrition and nutritional recovery, which can be used for future studies, helping to delineate periodized training strategies

REFERENCES

1. Lochs H, Allison SP, Meier R, Pirlich M, Kondrup J, Schneider S, van den Berghe G, Pichard C (2006) Introductory to the ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Terminology, Definitions and General Topics. *Clin Nutr* 25:180–186 . doi: 10.1016/j.clnu.2006.02.007
2. World Health Organization (2018) Levels & Trends in Child Mortality. World Heal Organ
3. Bourke CD, Berkley JA, Prendergast AJ (2016) Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends Immunol* 37:386–398 . doi: 10.1016/j.it.2016.04.003
4. Rytter MJH, Namusoke H, Babirekere-Iriso E, Kæstel P, Girma T, Christensen VB, Michaelsen KF, Friis H (2015) Social, dietary and clinical correlates of oedema in children with severe acute malnutrition: a cross-sectional study. *BMC Pediatr* 15:25 . doi: 10.1186/s12887-015-0341-8
5. Deutz NEP, Bauer JM, Barazzoni R, Biolo G, Boirie Y, Bosy-Westphal A, Cederholm T, Cruz-Jentoft A, Krznarić Z, Nair KS, Singer P, Teta D, Tipton K, Calder PC (2014) Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin Nutr* 33:929–936 . doi: 10.1016/j.clnu.2014.04.007

6. Jeronimo LC, Confortim HD, Centenaro LA, Brancalhão RMC, Pinheiro PFF, Matheus SMM, Torrejais MM (2016) Morphological and Morphometric Study of the Muscle Fibers and Neuromuscular Junctions of the Extensor Digitorum Longus in Aged Rats Submitted to Maternal Protein Restriction. *Int J Morphol* 34:396–403 . doi: 10.4067/S0717-95022016000100057
7. Lopes T de S, Quintana HT, Bortolin JA, Matos Alves PH, Bolina Matos R de S, Liberti EA, Oliveira F de (2017) Protein Malnutrition Pre- and Postnatal and Nutritional Rehabilitation Modulates the Morphology of Muscle Fibers in Wistar Rats. *J Diet Suppl* 14:278–287 . doi: 10.1080/19390211.2016.1212960
8. Pezolato VA, Mascarin AL, Paulino PC, Silva CA (2013) Electrocardiographic profile of rats after malnutritional recovery. *Med* 46:
9. Pimentel GD, Ropelle ER, Rocha GZ, Carvalheira JBC (2013) The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. *Metabolism* 62:171–178 . doi: 10.1016/j.metabol.2012.07.001
10. Pertille A, Moura KF, Matsumura CY, Ferretti R, Ramos DM, Petrini AC, Oliveira PC, Silva CA, Pertille A, Moura KF, Matsumura CY, Ferretti R, Ramos DM, Petrini AC, Oliveira PC, Silva CA (2016) Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. *Brazilian J Biol* 77:83–91 . doi: 10.1590/1519-6984.10415
11. Pezolato VA, Forti G, Dias R, Cieslak F, Krinski K, Abreu MF de, Costa P, Silva CA da (2015) Perfil hematológico de ratos submetidos a desnutrição protéica e recuperação nutricional. *Biomotriz* 9:2.
12. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA (2012) Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med* 1:267–286 . doi: 10.1515/plm-2012-0032
13. Simiyu Njororai WW (2010) Global inequality and athlete labour migration from Kenya. *Leisure/Loisir* 34:443–461 . doi: 10.1080/14927713.2010.543502
14. Rodrigues LD, Santos RA, Fontes RS, Santana R de O, Neves SMP (2013) *Manual de Cuidados e Procedimento com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP*, 1st ed. São Paulo
15. Simpson J, Kelly JP (2011) The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res* 222:246–264 . doi: 10.1016/j.bbr.2011.04.002
16. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC

(2007) MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING MICE: EFFECT OF EXERCISE TRAINING. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:760–765 . doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x

17. Brito Vieira WH, Halsberghe MJE, Schwantes MLB, Perez SEA, Baldissera V, Prestes J, Prestes P, Farias DL, Parizotto NA (2014) Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. *Braz J Biol* 74:444–9

18. Prestes J, Foschini D, Marchetti P, Charro MA (2010) *Prescrição e Periodização do Treinamento de Força em Academias.*, 1st ed. Manole, São Paulo

19. Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE (2003) Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 94:555–560 . doi: 10.1152/jappphysiol.00821.2002

20. de Brito Vieira WH, Ferraresi C, de Andrade Perez SE, Baldissera V, Parizotto NA (2012) 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* 27:497–504 . doi: 10.1007/s10103-011-0984-0

21. Ferraresi C, Parizotto NA, Pires de Sousa MV, Kaippert B, Huang Y-Y, Koiso T, Bagnato VS, Hamblin MR (2015) Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. *J Biophotonics* 8:740–754 . doi: 10.1002/jbio.201400087

22. Calders P, Matthys D, Derave W, Pannier JL (1999) Effect of branched-chain amino acids (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. *Med Sci Sports Exerc* 31:583–7

23. Banfi G, Dolci A (2003) Preanalytical phase of sport biochemistry and haematology. *J Sports Med Phys Fitness* 43:223–30

24. Lo S, Russell JC, Taylor AW (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28:234–236 . doi: 10.1152/jappl.1970.28.2.234

25. De Barros Manchado F, Gobatto CA, Vinícius R, Contarteze L, Papoti M, Rostom De Mello MA The maximal lactate steady state is ergometer-dependent in experimental model using rats

26. Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Boschero AC, Saad MJA, Velloso LA (1997) Glucose-Induced Insulin Secretion Is Impaired and Insulin-Induced Phosphorylation of the Insulin Receptor and Insulin Receptor Substrate-1 Are Increased in Protein-Deficient Rats. *J Nutr* 127:403–410 . doi: 10.1093/jn/127.3.403

27. Gueri M, Gurney JM, Jutsum P (1980) The Gomez classification. Time for a change? *Bull World Health Organ* 58:773–7
28. Latorraca MQ, Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Velloso LA, Saad MJA, Boschero AC (1998) Protein Deficiency and Nutritional Recovery Modulate Insulin Secretion and the Early Steps of Insulin Action in Rats. *J Nutr* 128:1643–1649 . doi: 10.1093/jn/128.10.1643
29. Avci P, Nyame TT, Gupta GK, Sadasivam M, Hamblin MR (2013) Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review. *Lasers Surg Med* 45:349–57 . doi: 10.1002/lsm.22153
30. Neira R, Arroyave J, Ramirez H, Ortiz CL, Solarte E, Sequeda F, Gutierrez MI (2002) Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 110:912–22; discussion 923–5
31. Jankowski M, Gawrych M, Adamska U, Ciescinski J, Serafin Z, Czajkowski R (2017) Low-level laser therapy (LLLT) does not reduce subcutaneous adipose tissue by local adipocyte injury but rather by modulation of systemic lipid metabolism. *Lasers Med Sci* 32:475–479 . doi: 10.1007/s10103-016-2021-9
32. Svedahl K, MacIntosh BR (2003) Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. *Can J Appl Physiol* 28:299–323
33. Santhiago V, da Silva AS, Papoti M, Gobatto CA (2009) Responses of Hematological Parameters and Aerobic Performance of Elite Men and Women Swimmers During a 14-Week Training Program. *J Strength Cond Res* 23:1097–1105 . doi: 10.1519/JSC.0b013e318194e088
34. Convertino VA (1991) Blood volume: its adaptation to endurance training. *Med Sci Sports Exerc* 23:1338–48
35. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Baroni BM, De Marchi T, Taufer D, Manfro DS, Rech M, Danna V, Grosselli D, Generosi RA, Marcos RL, Ramos L, Bjordal JM (2009) Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci* 24:857–863 . doi: 10.1007/s10103-008-0633-4
36. Guaraldo SA, Serra AJ, Amadio EM, Antônio EL, Silva F, Portes LA, Tucci PJF, Leal-Junior ECP, de Carvalho P de TC (2016) The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise. *Lasers Med Sci* 31:833–840 . doi: 10.1007/s10103-016-1882-2
37. De Marchi T, Leal Junior ECP, Bortoli C, Tomazoni SS, Lopes-Martins RÁB,

- Salvador M (2012) Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci* 27:231–236 . doi: 10.1007/s10103-011-0955-5
38. Silva AA de O, Leal-Junior ECP, D'Avila K de AL, Serra AJ, Albertini R, França CM, Nishida JA, de Carvalho P de TC (2015) Pre-exercise low-level laser therapy improves performance and levels of oxidative stress markers in mdx mice subjected to muscle fatigue by high-intensity exercise. *Lasers Med Sci* 30:1719–1727 . doi: 10.1007/s10103-015-1777-7
39. Zhang K-R, Liu H-T, Zhang H-F, Zhang Q-J, Li Q-X, Yu Q-J, Guo W-Y, Wang H-C, Gao F (2007) Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. *Apoptosis* 12:1579–1588 . doi: 10.1007/s10495-007-0090-8
40. Lewis MI, Sieck GC, Fournier M, Belman MJ (1986) Effect of nutritional deprivation on diaphragm contractility and muscle fiber size. *J Appl Physiol* 60:596–603 . doi: 10.1152/jappl.1986.60.2.596
41. Lo S, Russell JC, Taylor AW (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28:234–6
42. Jeejeebhoy KN (2012) Malnutrition, fatigue, frailty, vulnerability, sarcopenia and cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15:213–219 . doi: 10.1097/MCO.0b013e328352694f

Apêndice – II

Estudo II - traduzido para língua inglesa e adaptado para publicação.

Effects of photobiomodulation on muscle injury, associated with periodized aerobic training in malnourished and nutritionally recovered animals

Submetido: Journal of Photochemistry & Photobiology, em 21 de Janeiro de 2019,
sob referência JPHOTOBIOL_2019_85

Effects of photobiomodulation on muscle injury, associated with periodized aerobic training in malnourished and nutritionally recovered animals

Vitor Alexandre Pezolato¹, Rodrigo Dias, Ana Laura Martins de Andrade, Carlos Alberto da Silva, Nivaldo Antonio Parizotto

1. Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos zip code: 13565-905, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Protein malnutrition may occur due to lack of macro-nutrients such as proteins, carbohydrates, lipids and micro-nutrients. The deficiency of these nutrients can cause deficiency of body mass and stature as well as retardation in the neuro-psycho-motor development. Recent studies have sought to observe the consequences of malnutrition and protein recovery in the body of individuals with muscular injuries, emphasizing that the practice of physical exercises associated with therapeutic resources such as photobiomodulation (PBM) are able to accelerate the recovery of these individuals. Thus, this study aimed to investigate the consequences of malnutrition followed by protein recovery in animals with muscle injuries, in addition to observing the action of physical exercise associated or not with PBM in these animals. Seventy-two Wistar rats were used, divided into six groups, trained control (CT), trained and injured control (CTL), trained and irradiated trained control (CTLLa), recovered malnutrition (DR), recovered trained malnutrition (DRT), recovered and injured malnourished (DRTL), recovered malnourished trained injured and irradiated (DRTLLa). Muscle injury was performed through the cryosurgery technique in the belly of the anterior tibial muscle. Exercise treadmill was used for the trained groups and an infrared laser (780nm) for the irradiated groups. Mechanical tensile tests and determination of glycogen content, creatinine, globulins, albumin and total proteins were performed. The results of the traction test showed that the animals recovered, trained and treated with the PBM showed positive results, but the malnourished animals showed less resistance than the others and in relation to the concentration of glycoproteins the irradiated animals showed better

results. Thus, we can conclude that malnutrition directly affects muscular endurance, but with the aid of PBM and physical exercise a significant improvement can be obtained.

Keywords: muscle injury; malnutrition; photobiomodulation.

INTRODUCTION

Eating is something essential for human life, since this act is able to supply our daily metabolic needs and a wrong food habit is a public health problem, which can generate major deficiencies[1].

The lack of macro-nutrients like proteins, carbohydrates and/or lipids and/or micronutrient, may generate a framework of protein malnutrition, being capable of inducing differentiated magnitudes with regard to body mass and stature deficiency as well as delayed neuro-psycho-motor development, in addition to alterations associated with the energetic balance of the body[2–5]. Still, physical exercise concomitant with own protein intake are considered as primordial components for the optimization of muscle function through the aging process,[5] conditions can be influenced by the negative ballast of malnutrition[6].

Given the relationship of physical exercise and protein nutrition, in recent years the first placed of large races of long duration, such as marathons, are Kenyan or individuals of the African continent, whose has the highest levels of malnutrition[4]. There are several hypotheses, which try to justify this, as the proportions of the body, mainly longer legs with lower percentage of fat, racial differences, ability to perform an extension of the hip with lower oxygen consumption, higher concentrations of enzymes, which make the lipoxidation and burning of glycogen, directly influencing the result[7].

However, little is known about how the organism that has undergone a protein malnutrition in the main phases of body development adjusts itself to recover from muscular injuries, since studies show changes in lactate kinetics in the face of acute exertion[8], as well as changes in insulin response, albumin and decreased glucose oxidation in the soleus muscle, as well as the concentration of glycogen[9, 10].

Muscular injuries are common consequences in the sports and labor areas, and its severity may affect the muscular function causing sports impairment, which may result in contractures, pain, leading to muscular atrophy and increased the chance of a re-injury[11, 12]. Recent studies have shown that Photobiomodulation (PBM) presents positive results in the treatment of muscular repair, due to the increased activity of vascular endothelial growth factor (VEGF), the myogenic regulation factor (MyoD), still reducing the concentration of type I collagen, avoiding fibrosis[13]. PBM is still able to generate the decrease of muscle damage markers creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), increased mitochondrial stimulation, mainly from the cyto chromium C oxidase, improving the indices of muscle fatigue and physical performance, mainly, aerobic [14].

Thus, the condition of recovery of muscular injury in situations of protein malnutrition with subsequent, nutritional recovery, during the practice of long-term aerobic physical activity, is still unknown, opening new perspectives of research on the mechanical and metabolic behavior, associated or not with treatment strategies through biophysical agents.

Thus, this study aimed to ascertain whether protein malnutrition, followed by nutritional recovery can leave sequelae, which compromise recovery after a muscular injury or decrease muscle resistance to traction and may facilitate a re-injury, still measuring if the PBM is able to alter the energetic muscular behavior, aiding for an early rehabilitation.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Animals:

Seventy-two Wistar rats (*Rathus norvegicus var, albinus*, Rodentia, Mamalia) were weaned on the 21st day of life from Anilab® (Paulínia-SP). The animals were kept in the vivarium in collective cages containing 5 and 7 animals, for animals submitted to adequate protein nutritional status and to animals submitted to malnutrition/protein recovery conditions, respectively.

Furthermore, the animals received water and feed *ad libitum* and were kept in an environment with controlled temperature of 23 ± 2 °C and adequate lighting, light/dark cycle of 12 hours, with light on after 6:00 hours. It should be pointed out that, with regard to cleaning the cages, the procedure was adopted to transfer a small portion of the material from the dirty cage (shaving with faeces and urine) to the

clean cage, after which, more clean shavings were added and the homogenization was carried out of the wood with the aim of maintaining the olfactory marks and consequently the stability of the social hierarchy of the animals in each cage, reducing possible peaks of stress [15].

Still, during the entire experimental period, the animals were continuously exposed systematically/organized to differentiated conditions of enriched environment, considering previously published orientations[15], in order to minimize the monotony of confinement and provide greater possibility of natural interactions of the species with regard to environmental and social issues. Acknowledged, the condition of enriched environment, has the potential to minimize the level of stress and, consequent, mind increased possibilities of obtaining more stable animals in relation to physiological and psychological parameters[16], ensuring better scientific results.

The animals were treated according to the recommendations of the *Guide for Care Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996), being the work approved by the Committee on Animal Experimentation of the Methodist University of Piracicaba (UNIMEP) under protocol number 04/16.

Experimental Groups

After the weaning period of the animals, the same were randomly divided into 6 groups, containing 7 animals in each, so-called: control (C), trained control (CT), trained control and injured (CTL), trained control Injured and irradiated (CTLLa), Recovered malnourished (DR), trained recovered malnourished (DRT), recovered malnourished and injured (DRTL), recovered malnourished injured and irradiated (DRTLLa). Group C and DR on day 45 of the experiment will be titrated as C45 and DR45, respectively, on day 90 of experiment, C90 and DR90, respectively. The total period of experiment was 129 days and from the day 90 until the day 126 there was physical training, and the last day, the experimental collections.

Experimental Design

In Groups C, CT, CTL and CTLLa Passed through the normoproteic diet (AN 93 M 14%) and the groups DR, DRT, DRTL and DRTLLa went through a hypoproteic diet (AN 6%) for 45 days, causing the state of protein malnutrition and were recovered with a normoproteic diet for 45 days.

When they reach 83 ° day of experiment, the groups have undergone an adaptation protocol on the treadmill and subsequently by a physical training program, which day 90 and lasts 36 days, with the exception of groups C and DR.

The groups CTL, CTLLa, DRTL and DRTLLa suffered the cryolesion on the 118 day of the experiment, resting for 3 days until they returned to the physical training program, and the CTLLa and DRTLLa groups received low-intensity laser irradiation after each training session after they suffered the cryolesion. See Figure 1 for better visualization of the experimental design.

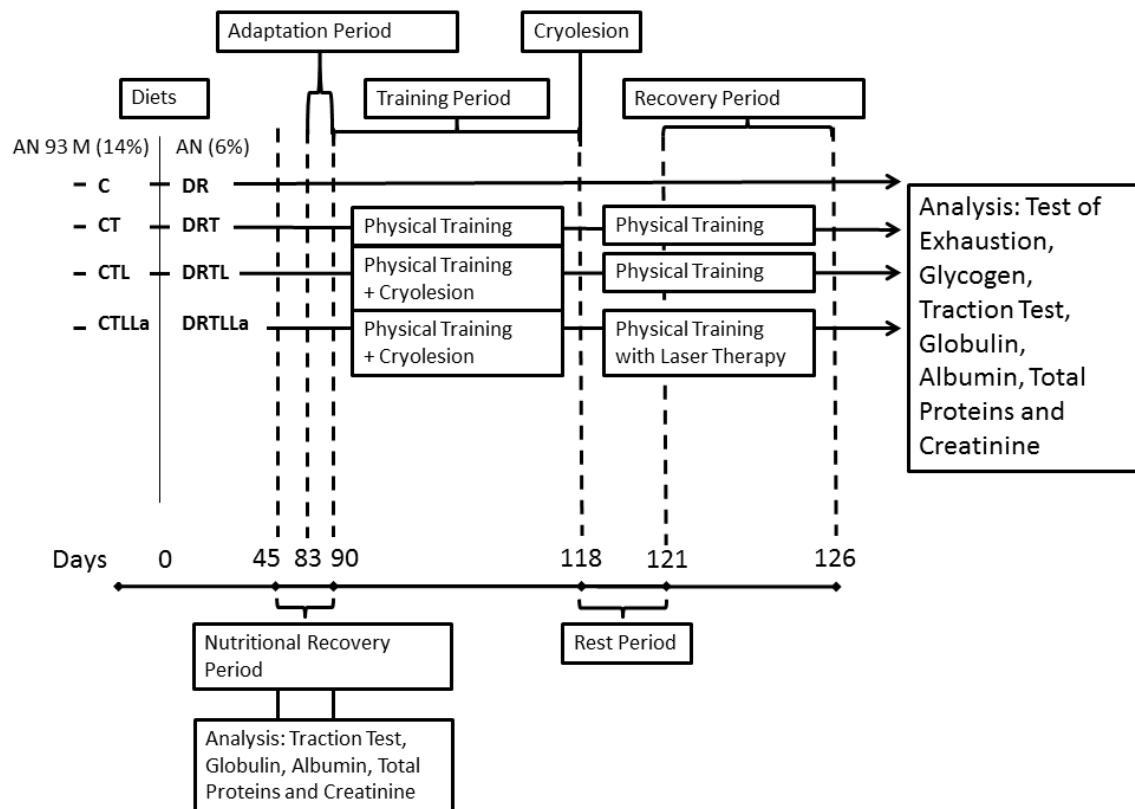


Figure 1 - Experimental design, following a time line with the analyzes that were performed at each moment.

Malnutrition and Nutritional Recovery Protocol

The animals of groups C, CT and CTL and CTLLa were fed with the AIN 93 M normoproteic diet, containing 14% protein, while the animals of the groups DR, DRT, DRTL and DRTLLa were fed a hypoproteic diet containing 6% protein for 45 days, food commercialized by Pragsoluções services and trade LTDA; Fiscal ID (CNPJ): 03.420.938/0001-59/IE 401,091,476,112-ME. Subsequently, the animals went through the process of nutritional recovery, being fed with a normoproteic diet

AIN 93 M, containing 14% of protein for the period of 45 days. The compositions of the aforementioned diets are described previously (Table 1).

Table 1- Composition of the diets (g / kg) used for malnutrition and nutritional recovery.

Diet AN 93 M -14% protein		Diet AN - 6% protein (malnutrition)	
Ingredients for 1 Kg	Grams	Ingredients for 1 Kg	Grams
Corn starch	465.700	Corn starch	508.000
Casein	140.000	Casein	66.000
Dextrinized Starch	155.000	Dextrinized Starch	166.500
Sucrose	100.000	Sucrose	121.000
Soybean Oil	40.000	Soybean Oil	40.000
Fiber	50.000	Fiber	50.000
L-cystine	1.800	L-cystine	1.000
Chloride Choline	2.500	Chloride Choline	2.500
Mineral Mix	35.000	Mineral Mix	35.000
Vitamin Mix	10.000	Vitamin Mix	10.000
TOTAL	1000.0	TOTAL	1000.0

Treadmill and Animal Adaptation

To perform the physical training programs, an ergometric treadmill of the brand Rebook TR2 Premierrun Treadmill® (Adidas do Brasil, Embú, SP, Brazil) was used, featuring 8 lanes, with speed marking in meters per minute ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) and automatic tilt. The animals who received training passed by adaptation on the treadmill in the last week of nutritional recovery representing the days 83 until the day 90 of the experiment. The adaptation protocol consisted of placing the animals on the treadmill for one week, without inclination, with a progressive increase of the velocity until reaching $18 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ (mean value of the first week of training), with a progressive increase in the running time until reach 15 minutes.

Periodized Physical Training Program with Linear Polishing

The Aerobic Training protocol was performed daily, from Monday to Friday, for 36 days in the afternoon. This protocol presents periodization of volume and intensity following active rest periods (table 2).

This graduation aims to enable an adaptation of animals to training, thus recommending a predominance of aerobic training. Its intensity was calculated according to the lactate levels found in the studies by Ferreira[17] and Brito Vieira[18].

The beginning of the Training was performed with a lower workload (10% speed and predetermined time for the day) as a form of warming, as previously recommended[19].

Photobiomodulation

It was used a low-intensity laser GaAlAs (MM Optics, São Carlos, SP, Brazil), and this was calibrated and gauged before the experimental procedure, by following the parameters the study of Brito Vieira[20] (Table 3).

The irradiations were performed in a punctual way, in the muscular belly of the anterior tibial and triceps sural immediately after the sessions of the physical exercises, in order to seize the conditions of "physics stress" and, consequently, metabolic alterations of the animal, with a view to greater efficacy of the laser in these conditions[21].

All animals were trichotomized in the region where they received the irradiations, and during the application, a cotton blanket was used to contain the animal.

Table 3 - GaAlAs laser parameters used:

Parameters	Values
Power (mW)	70
Wavelength (nm)	780
Mode of Action	Continuous
Beam transverse area (cm ²)	0.04
Energy Density (J/cm ²)	214
Time (s)	122
Energy (J)	8,54

Weight determination

Weekly, the animals were weighed through the digital scale (Indústria Filizola, São Paulo, SP, Brazil).

Physical Performance Determination

For the determination of physical performance, the same was evaluated initially from the perspective of the maximal lactate stable phase, following the parameters from Ferreira [17] and Brito Vieira [18] through the lactate kinetics at a specific stress load. For this purpose, the animals performed physical exercise in the treadmill at the intensity of 20 m/min^{-1} , being the exhaustion was defined as the point at which the animals were unable to continue the stride for 1 minute[22].

Surgical Technique and Cryolesion Protocol

The animals were anesthetized according to body weight with intraperitoneal injection of a solution composed of Ketamine Hydrochloride (0.05 mg / kg) and Xilazine Hydrochloride (0.03 mg / kg). Then, the skin covering the muscle was trichotomized and sanitized so that a longitudinal incision of approximately 1.5 cm was made in the region corresponding to the belly of the anterior tibialis muscle.

In the literature are the study of Miyabara [23] that used cryolesion (tissue injury induced by cooling) to perform muscle injury. Thus, this protocol was chosen because it is easily reproductive and generates a homogeneous (non-diffuse) lesion compared to other techniques by mechanical loads, such as stretching injury through concentric exercise[24] and eccentric[25].

Cryolesion was performed in the belly region of the anterior tibialis muscle. For this, an iron rod with a tip of 0.5 cm^2 was previously immersed in liquid nitrogen for 10 seconds, then pressed perpendicularly against the muscular womb for 30 seconds. After a further cooling of the stick for 10 seconds, this procedure was repeated and, at the end, the skin was sutured (3-0 nylon SHALON Ltda.) and cleaned with iodized alcohol.

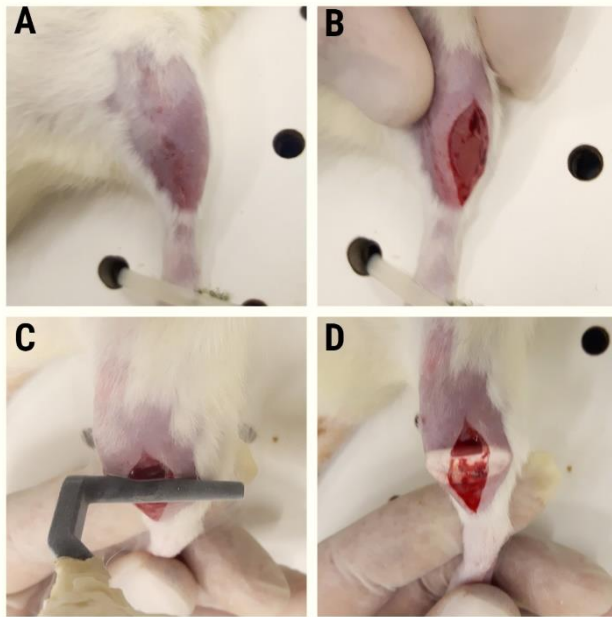


Figure 2 - A: Trichotomization of the region, which was carried out in the cryolesion. B: Process of exposure of the muscularis of the tibialis anterior. C: Placement of the stem, which passed through the liquid nitrogen, on the muscular belly. D: End of the cryolesion process.

Post-surgical rest period

Due to the pain and discomfort of the lesion in the first postoperative hours, the animals were unable to perform physical exercises. Thus, they remained in rest in their cages with drug treatment with 8 drops of Metamizol (Dipirona[®]) (Germed Pharma, Campinas, SP, Brazil) dissolved in 500 ml of water, for a period of 3 postoperative days.

Mechanical Traction Test

Disarticulation of the coxofemoral rats occurred, and the leg muscles were completely removed except for the anterior tibialis and, in another leg, the soleus and gastrocnemius muscles, forming the triceps sural. The bones of the leg (tibia and fibula) were sectioned 5mm above the ankle joint and 5mm below the origin of the muscle. The mechanical characteristics of the muscles were analyzed in the universal testing machine DL 2000 (EMIC, São Paulo, SP, Brazil), belonging to the Laboratory of Mechanical Construction Materials of the School of Engineering, Architecture and Urbanism of the Methodist University of Piracicaba (UNIMEP). *campus* of Santa Bárbara d'Oeste. In order to perform the test, a device was used for the fixation of the femur to the mobile caliper and the foot to the fixed caliper of the machine, maintaining the muscle positioned longitudinally the applied tensile force. All samples were pre-tensioned with 0.15N and the set speed for the test was 5

millimeters per minute, with measurements taken every 0.5 millimeters [26]. The temperature of the mechanical test laboratory was $23\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Determination of Glycogen Content

To collect samples, the rats were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (Dopalen®) (Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínea, SP, Brazil), and xylazine hydrochloride (Rompun®) (Bayer SA, São Paulo, Brazil), intraperitoneal route, considering previously published guidelines of $0.1\text{mL}\cdot 100\text{g}^{-1}$ and $0.07\text{mL}\cdot 100\text{g}^{-1}$, respectively [15]. Since no pain stimuli were confirmed, the animals were decapitated and the tissues were removed, which were frozen in the biofreezer at -70°C .

To determine the glycogen content, after thawing of samples of the soleus, gastrocnemius (white and red portion) and anterior tibial muscle, the samples were submitted to digestion in potassium hydroxide (KOH) 30% and the glycogen was precipitated from the passage through hot ethanol. Between one phase and another of the precipitation, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes, with the glycogen submitted to acid hydrolysis in the presence of phenol, considering previously published guidelines [27], being the results expressed in mg / 100mg of wet tissue.

Determination of the Concentration of Creatinine, Globulins, Albumin and Total Proteins

The routine techniques of hematology laboratories were determined for the determination of creatinine, globulins, albumin and total proteins. The results were expressed as $\mu\text{mol/L}$, g/dL , g/dL and g/dL , respectively.

Statistical Analysis

The data collected were tabulated and later analyzed by the statistical software "GraphPad Prism 7". Statistical analysis was performed using the Shapiro-Wilk test to verify normality.

Parametric data were analyzed by one-way ANOVA, when it was the case, thow-way ANOVA, followed by the Tukey test, while non-parametric variables

passed the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test. In all calculations a critical level of $p < 0.05$ was set for statistical significance.

RESULTS

Body Weight

Table 3 - Body mass (g) of the animals, in the different periods of the experiment. Values are means and standard deviations. * $p < 0,05$ when comparing with group C on day 126 of experiment; # $p < 0,05$ when comparing with group DR on day 126 of experiment

Dia	C	DR	CT	DRT	CTL	DRTL	CTLLa	DRTLLa
0	40,6±3,1	39,1±1,6	40,3±1,5	38,8±3,5	39,6±3,2	37,1±1,5	41,3±2,5	39,8±2,3
45	305,2±31,3	59,5±9,4	243±7,8	59,4±15,1	300,2±22,3	62,4±8,3	239,2±6,7	58,9±14,1
90	393±44,3	223,5±17,5	416,8±15,5	216,6±20,1	415,4±16,7	217,4±14,5	402,6±15,8	223,8±19,7
126	459,6±48,7	304,78±31,5*	421±2,7*#	282,6±34,8*	399±8,9*#	250,2±18,5*#	416,8±20*#	259,6±14,7*#

Analyzing the body mass data, at the initial moment of the experiment (day 0), there was no statistical difference ($p > 0.05$) when comparing the groups, however from day 45 to day 126 of experiment, all groups that hypoproteic diet (DR, DRT, DRTL and DRTLLa), had a statistically significant ($p < 0.05$) body weight decrease when compared to the groups that fed only the normal protein diet (C, CT, CTL, CTLLa), evidencing that protein malnutrition definitely affects the body mass even after protein recovery.

Group C, on day 126 of the experiment, was shown to have higher values of body mass in relation to the groups CT, CTL, CTLLa ($p = 0.0487$, $p < 0.0001$, $p = 0.0181$, respectively), demonstrating that physical exercise helps in reducing body weight (Table 4).

The DR group, on day 126 of the experiment, presented higher values of body mass in relation to the DRTL and DRTLLa groups ($p = 0.0007$ and $p = 0.0098$, respectively) (Table 4).

Globulin, Albumin, Total Proteins and Creatinine

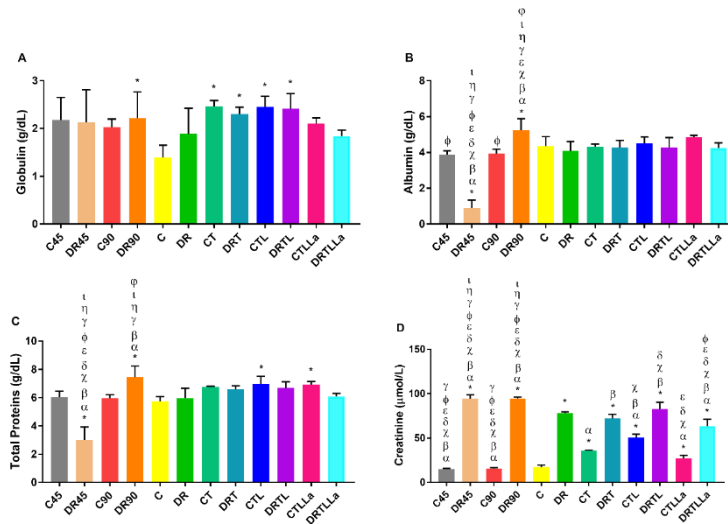


Figure 3 - A: Serum globulin level. B: Serum albumin level. C: Total proteins in the blood. D: Serum creatinine level. * statistical difference in relation to group C, where $p < 0,05$; α statistical difference in relation to group DR, where $p < 0,05$; β statistical difference in relation to group CT, where $p < 0,05$; χ statistical difference in relation to group DRT, where $p < 0,05$; δ statistical difference in relation to group CTL, where $p < 0,05$; ε statistical difference in relation to group DRTL, where $p < 0,05$; ϕ statistical difference in relation to group CTLLa, where $p < 0,05$; γ statistical difference in relation to group DRTLLa, where $p < 0,05$; η statistical difference in relation to group C45, where $p < 0,05$; φ statistical difference in relation to group DR45, where $p < 0,05$; ι statistical difference in relation to group C90, where $p < 0,05$.

In relation to the globulin concentration (Figure 3-A), it was seen that group C had lower concentrations when compared to CT groups ($p=0.038$), DRT ($p=0.0253$), CTL ($p=0.004$), DRTL ($p=0.006$) and DR90 ($p=0.042$).

The albumin concentration (Figure 3-B) was very low in the DR45 group, showing that there is a statistical difference ($p < 0.05$) when comparing with all other groups. However, the DR90 group had higher concentrations of albumin ($p < 0.05$) when compared to groups C, DR, CT, DRT, DRTL, DRTLLa, C45 and C90. The CTLLa group had higher albumin concentrations than the C45 ($p=0.026$) and C90 ($p=0.045$) groups. When analyzing the total protein concentration, the DR45 group had the smallest amounts when compared to all other groups ($p < 0.05$). Differently from the DR90 group, which had higher concentrations ($p < 0.05$) when compared to groups C, DR, CT, DRTLLa, C45 and C90. Furthermore, group C had reduced total protein values when purchased with the CTL ($p=0.026$) and CTLLa ($p=0.034$) groups.

Finally, it is seen that the C45, C90 and C groups have a lower creatinine concentration when compared to the other groups. The opposite occurs with the levels

of DR45 and DR90, which have higher concentrations ($p < 0.05$) when compared to the others, with no difference between them ($p > 0.999$).

On the creatinine level, the DR group presented higher levels of concentration in relation to the CT groups ($p < 0.001$), CTL ($p < 0.001$), CTLLa ($p < 0.001$) and DRTLLa ($p < 0.001$). The CT group had lower amounts of creatinine when compared to the DRT ($p < 0.001$), CTL ($p < 0.001$), DRTL ($p < 0.001$) and DRTLLa ($p < 0.001$) groups. The DRT group had lower concentrations when compared to the DRTL group ($p = 0.006$) and higher concentrations in relation to the CTL ($p < 0.001$), CTLLa ($p < 0.001$) and DRTLLa ($p = 0.040$) groups.

Still, the CTL group had lower concentrations in relation to the DRTL ($p < 0.001$) and DRTLLa ($p = 0.002$) groups and higher concentration when compared to the CTLLa group ($p < 0.001$). The DRTL group had a higher concentration in relation to the CTLLa ($p < 0.001$) and DRTLLa ($p < 0.001$) groups. Finally, the CTLLa group had a lower concentration when purchased with DRTLLa ($p < 0.001$).

Traction Test

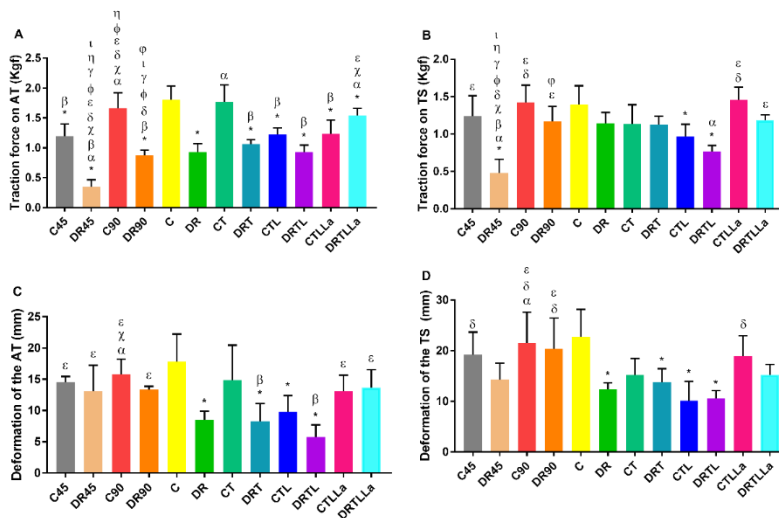


Figure 4 - A: Traction test of the anterior tibial muscle (TA). B: Triceps muscle stiffness test (TS). C: Deformation until rupture of AT muscle. D: Deformation until TS muscle rupture. * statistical difference in relation to group C, where $p < 0,05$; α statistical difference in relation to group DR, where $p < 0,05$; β statistical difference in relation to group CT, where $p < 0,05$; χ statistical difference in relation to group DRT, where $p < 0,05$; δ statistical difference in relation to group CTL, where $p < 0,05$; ϵ statistical difference in relation to group DRTL, where $p < 0,05$; ϕ statistical difference in relation to group CTLLa, where $p < 0,05$; γ statistical difference in relation to group DRTLLa, where $p < 0,05$; η statistical difference in relation to group C45, where $p < 0,05$; φ statistical difference in relation to group DR45, where $p < 0,05$; ι statistical difference in relation to group C90, where $p < 0,05$.

In relation to the traction test, which aims to measure the maximum traction force until the total rupture of the muscle, as well as how it was deformed for this to happen, the data were analyzed and thus demonstrating that the DR45 group resisted lower Kgfs until muscle disruption to C45, both for the anterior tibial muscle ($p<0.001$) (figure 3-A) and for the triceps muscle ($p<0.001$) (Figure 4 -B). This parameter was maintained even after nutritional recovery, since C90 presented superior results in relation to DR90 ($p<0.001$) only in the anterior tibial muscle (figure 3-A).

Now, the anterior tibial muscle of group C was more resistant to the traction test when compared to the DR, DRT, CTL, DRTL, CTLLa and DRTLLa groups, with $p<0.05$ for all comparisons. The DR group, however, resisted at less Kgfs when compared to CT ($p<0.001$) and DRTLLa ($p<0.001$) (figure 4-A).

On the other hand, the CT group, their anterior tibial muscle, was able to withstand the traction with higher loads when compared to the DRT, CTL, DRTL, and CTLLa groups, being $p<0.05$ for all comparisons. Furthermore, the DRTLLa group resisted higher loads when compared with the DRT ($p=0.024$) and DRTL ($p<0.001$) groups (Figure 4-A).

When analyzing the triceps sural muscle, group C had higher tensile strength when compared to CTL ($p=0.011$) and DRTL ($p<0.001$) groups. The CTLLa group was able to withstand the higher stress load when compared to CTL ($p=0.001$) and DRTL ($p<0.001$). Finally, the DRTLLa group overcame the tension load of the DRTL group ($p=0.016$), showing that the PBM assists in tensile strength, both for animals fed on a normoproteic diet and for those that did not (Figure 4- B).

On the deformation of the anterior tibial muscle until its total rupture, group C was able to stretch more than the DR ($p<0.001$), DRT ($p<0.001$), CTL ($p=0.005$) and DRTL groups ($p<0.001$). The CT group also obtained results of greater deformation when comparing with the DRT ($p=0.047$) and the DRTL ($p=0.001$) groups. Furthermore, PBM may aid in the gain of muscle deformation, since the DRTL group presented lower results when compared with the CTLLa ($p=0.018$) and DRTLLa ($p=0.007$) groups. Groups C45, DR45, C90 and DR90 did not present any differences.

Regarding the triceps muscle, it was possible to observe that the C group resisted the greatest deformation until its total rupture, in relation to the DR ($p=0.007$), DRT ($p=0.036$), CTL ($p<0.001$) and DRTL ($p<0.001$). On the other hand,

the CTLLa group resisted the greatest deformation when compared to CTL ($p=0.041$). Groups C45, DR45, C90 and DR90 did not present any differences.

Muscle Glycogen and Exhaustion Test

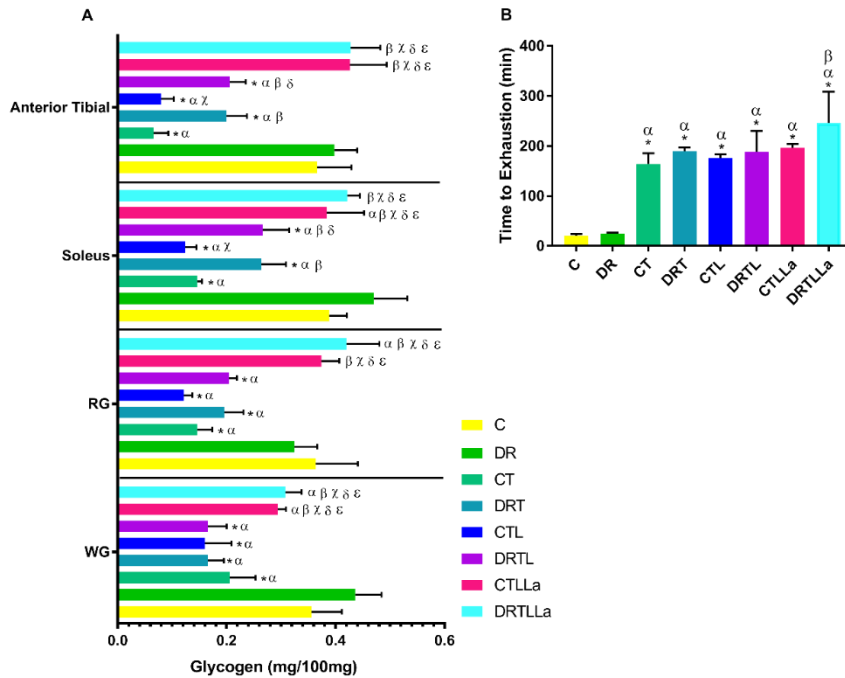


Figure 5 - A: Muscle glycogen. B: Exhaust test. * statistical difference in relation to group C, where $p<0,05$; α statistical difference in relation to group DR, where $p<0,05$; β statistical difference in relation to group CT, where $p<0,05$; χ statistical difference in relation to group DRT, where $p<0,05$; δ statistical difference in relation to group CTL, where $p<0,05$; ϵ statistical difference in relation to group DRTL, where $p<0,05$.

On muscle glycogen, it is clear that the C and DR groups have higher concentrations of muscle glycogen in WG, RG, Soleus and Tibial Anterior than in the CT, DRT, CTL and DRTL groups, for all comparisons $p<0.05$ (Figure 5-A).

As for the groups who suffered irradiation after going through cryoinjury (CTLLa and DRTLLa), had higher glycogen values in WG muscles, RG, Soleus and anterior tibialis, when compared to the CT, DRT, CTL and DRTL groups, for all comparisons $p<0.05$, demonstrating that PBM may aid in muscle metabolic recovery.

Also, in the soleus and tibialis anterior muscles, the DRT and DRTL groups obtained higher glycogen concentrations in relation to the CT and CTL groups, for all comparisons $p<0.05$.

On the exhaustion test that aimed to observe the physical performance of the animals to measure if a muscle injury could affect performance, in order to compare with trained groups to determine if there was a complete recovery, it was seen that

groups C and DR, obtained lower results than the other groups that underwent the physical training program. The DRTLLa group also performed better than the CT group ($p=0.031$). The other comparisons did not show significant differences (Figure 5-B).

DISCUSSION

The reduction of body mass is one of the parameters to justify the model of protein malnutrition, this model when applied in the early stages of development can lead to permanent physical changes, which was justly reported in our results, since the nutritionally recovered and undernourished groups never reached the weight of the animals that performed the normoprotein diet, obviously the low availability of amino acids confirmed the induction of malnutrition[28], yet, because it has a greater difference of 40% of the body mass at the 45th and 90th day of the experiment, this decrease characterizes third degree malnutrition in humans[29]. These findings contribute to the various[30–33], evidencing the importance of the intake of amino acids in the initial stages of development so that the body mass evolves properly and does not occur permanent changes, as seen in this research.

Moreover, aerobic exercise is capable of decreasing body mass, as reported in the present study, since sedentary groups obtained high weight values, because this type of training is capable of increasing insulin sensitivity, stimulating lipolysis by increasing the circulation of catecholamines, increasing free fatty acids, growth hormone and glycerol[34, 35]. This did not occur when comparing the DR group with the DRT, demonstrating that the injury factor can lead to a decrease in body mass, since hormonal responses occur, such as decreased insulin sensitivity at the site, which may promote muscle loss and muscle strength[36], in addition, the DRTLLa group, besides passing through the muscle lesion, was irradiated, so the PBM may have aided in the decrease of the body mass, since it is able to activate the chromophores of the mitochondria, increasing the oxygen consumption, consequently increasing the reactive species of oxygen (ROS), releasing nitric oxide (NO), which help lipolysis[37].

The level of globulin is directly linked with circulating antibodies and is an important factor for protection against infections, yet its level can be elevated when tissue lesions occur due to an inflammatory response, so it is normal for globulin

levels to be higher in situations of aerobic physical activity, or even muscle injury[38, 39], justifying because group C had lower concentrations.

Already the level of albumin and total proteins was low in the DR45 group, demonstrating that the lack of amino acids in the diet can lead to this condition, unlike the DR90 group that has high levels and can be justified by their absorption deficiency, since it can decrease the diameter of the muscular fibers, generate contractile deficiencies of the soleus muscle and TA, inducing a predominance of oxidative fibers[30, 40, 41]

Creatinine is a byproduct of the metabolism of creatine phosphate, a source of high energy, essential in the process of muscle contraction, but it is a marker of renal failure, in this way its higher levels are seen in physical activity practitioners[42], as reported in the trained groups of this article, however, groups that were nutritionally malnourished and recovered always maintained their highest levels in comparison to their controls, thus being able to predict renal damage, a sequelae possibly acquired by the amino acid limitation in the stages of body development. Unfortunately, the lack of deeper analyzes of renal function was not made, and this is a limitation of the present study.

Malnutrition seems to influence muscle formation, since the anterior tibialis muscle and the triceps sural of the DR45 group resisted little tension load in the mechanical traction test. Once again emphasizing the importance of the intake of amino acids in the early stages of development. However, even though nutritional recovery was performed, the anterior tibial muscle supported a lower load of the DR90 group in relation to its control, demonstrating the sequelae that malnutrition can lead to, and may facilitate muscular injury, being justified by the contractile and elastic modifications of the skeletal muscle tissue, in face of the modulations in the synthesis of collagen and titin in the initial stages of growth that hung until the adulthood[43].

Still, we can affirm that the CTL and CTLLa groups did not have a complete recovery of the anterior tibial muscle, since the difference in relation to the CT group, whose term might have been short for this to happen, different from the DRTLLa, which reached complete muscle recovery seen its results in the tensile test, since photobiomodulation (PBM) may have increased the activity of VEGF, MyoD, which aided the correct synthesis of collagen[13], different from the CTLLa, malnutrition

may generate an increase of type I and IIa fibers, with lower type IIb ratios[43], since the low-intensity laser is capable of activating the mitochondria, improving cellular respiration[14], by type I and IIa fibers have more mitochondria, may have accelerated the regenerative process.

The results of the deformation only exalt the difficulty of the DRT, DRTL groups in not being able to reach the level of elasticity of a common muscle, yet, the DRTLLa group obtained better results in relation to the DRT and DRTL, once again by the said changes of the PBM[13, 14, 43].

The CT and DRT groups had lower concentrations of muscle glycogen WG, RG and S than groups C and DR, although aerobic exercise increased the expression of AKT, AKT phosphorylation and Glycogen synthase Kinase-3 β phosphorylation[44], this may have occurred because of the short rest period after the exhaustion test (3 days), however the CTLLa and DRTLLa groups obtained higher glycogen reserves when compared to CTL and DRTL, demonstrating that the power of light can increase glycogen reserves and assist in an early recovery, especially because the exhaustion test demonstrated that the DRTLLa group obtained better results in relation to the CT. Also, early physical exercise in muscle injury is able to maintain performance parameters in long-term aerobic exercise, as seen in Figure 4-B, reinforcing early intervention in these cases, even more with the help of PBM to increase the reserves of glycogen. Finally, it seems that malnutrition and nutritional recovery do not negatively affect recovery after a muscle injury in the performance parameters but can generate permanent damage to the kidneys and the contractile structure and muscle deformation, allowing a greater chance of injury.

CONCLUSION

Protein malnutrition can generate permanent damages in the body growth and in the structures related to muscular resistance to tension, being able to facilitate the muscle breakdown with a lower imposed load, however, with the use of PBM, the improvement in resistance is visible, and it can be used in rehabilitation protocols, along with physical training. Furthermore, it can increase glycogen reserves, facilitating recovery for an early improvement in performance in long-term aerobic exercises. Finally, PBM seems to be able to decrease the serum creatinine level, but this parameter should be better investigated.

REFERENCES

1. Blössner M, De M, Series O, Prüss-Üstün A, Campbell-Lendrum D, Corvalán C, Woodward A (2005) Malnutrition Quantifying the health impact at national and local levels World Health Organization Nutrition for Health and Development Protection of the Human Environment Geneva 2005 WHO Library
2. Bourke CD, Berkley JA, Prendergast AJ (2016) Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends Immunol* 37:386–398 . doi: 10.1016/j.it.2016.04.003
3. Rytter MJH, Namusoke H, Babirekere-Iriso E, Kæstel P, Girma T, Christensen VB, Michaelsen KF, Friis H (2015) Social, dietary and clinical correlates of oedema in children with severe acute malnutrition: a cross-sectional study. *BMC Pediatr* 15:25 . doi: 10.1186/s12887-015-0341-8
4. Organization WH (2018) Levels & Trends in Child Mortality. World Health Organization
5. Deutz NEP, Bauer JM, Barazzoni R, Biolo G, Boirie Y, Bosity-Westphal A, Cederholm T, Cruz-Jentoft A, Krznarić Z, Nair KS, Singer P, Teta D, Tipton K, Calder PC (2014) Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin Nutr* 33:929–936 . doi: 10.1016/j.clnu.2014.04.007
6. Hébuterne X, Bermon S, Schneider SM (2001) Ageing and muscle: the effects of malnutrition, re-nutrition, and physical exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4:295–300 . doi: 10.1097/00075197-200107000-00009
7. Simiyu Njororai WW (2010) Global inequality and athlete labour migration from Kenya. *Leisure/Loisir* 34:443–461 . doi: 10.1080/14927713.2010.543502
8. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR (2007) Determinação da transição metabólica através do teste de lactato mínimo em ratos desnutridos durante o exercício de natação. *Rev da Educ Física* 18:33–39
9. Oliveira EC de, Gonçalves AC, Silva M, Pedrosa ML, Silva ME (2015) Treino físico promove aumento de peso em ratos desnutridos sem causar stress oxidativo. *Motricidade* 11:25–35 . doi: 10.6063/motricidade.3175
10. Prada FJA, Macedo DV, Mello MAR de (2007) Oxidative stress during rehabilitation from protein malnutrition associated with aerobic exercise in rats. *Brazilian Arch Biol Technol* 50:45–55 . doi: 10.1590/S1516-89132007000100006

11. Rennó ACM, Toma RL, Feitosa SM, Fernandes K, Bossini PS, de Oliveira P, Parizotto N, Ribeiro DA (2011) Comparative Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Low-Level Laser Therapy on Injured Skeletal Muscle. *Photomed Laser Surg* 29:5–10 . doi: 10.1089/pho.2009.2715
12. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM (2011) The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. *Inflamm Res* 60:347–356 . doi: 10.1007/s00011-010-0277-2
13. Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, de Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA (2013) Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci* 28:947–955 . doi: 10.1007/s10103-012-1183-3
14. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA (2012) Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med* 1:267–286 . doi: 10.1515/plm-2012-0032
15. Rodrigues LD, Santos RA, Fontes RS, Santana R de O, Neves SMP (2013) *Manual de Cuidados e Procedimento com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP*, 1st ed. São Paulo
16. Simpson J, Kelly JP (2011) The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res* 222:246–264 . doi: 10.1016/j.bbr.2011.04.002
17. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC (2007) Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:760–765 . doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x
18. Brito Vieira WH, Halsberghe MJE, Schwantes MLB, Perez SEA, Baldissera V, Prestes J, Prestes P, Farias DL, Parizotto NA (2014) Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. *Braz J Biol* 74:444–9
19. Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE (2003) Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 94:555–560 . doi: 10.1152/jappphysiol.00821.2002
20. de Brito Vieira WH, Ferraresi C, de Andrade Perez SE, Baldissera V, Parizotto NA (2012) 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* 27:497–504 . doi: 10.1007/s10103-011-0984-0

21. Ferraresi C, Parizotto NA, Pires de Sousa MV, Kaippert B, Huang Y-Y, Koiso T, Bagnato VS, Hamblin MR (2015) Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. *J Biophotonics* 8:740–754 . doi: 10.1002/jbio.201400087
22. Calders P, Matthys D, Derave W, Pannier JL (1999) Effect of branched-chain amino acids (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. *Med Sci Sports Exerc* 31:583–7
23. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R (2006) Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Physiol* 290:C1128–C1138 . doi: 10.1152/ajpcell.00399.2005
24. Malaguti M, Angeloni C, Garatachea N, Baldini M, Leoncini E, Collado PS, Teti G, Falconi M, Gonzalez-Gallego J, Hrelia S (2009) Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. *J Appl Physiol* 107:1028–1036 . doi: 10.1152/jappphysiol.00293.2009
25. Lima-Cabello E, Cuevas MJ, Garatachea N, Baldini M, Almar M, González-Gallego J (2010) Eccentric exercise induces nitric oxide synthase expression through nuclear factor- κ B modulation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 108:575–583 . doi: 10.1152/jappphysiol.00816.2009
26. Lima S, Caierão Q, Durigan J, Schwarzenbeck A, Silva C, Minamoto V, Guirro R (2007) Curto período de imobilização provoca alterações morfológicas e mecânicas no músculo de rato. *Rev Bras Fisioter* 11:297–302 . doi: 10.1590/S1413-35552007000400009
27. Lo S, Russell JC, Taylor AW (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28:234–236 . doi: 10.1152/jappl.1970.28.2.234
28. Reis MAB, Carneiro EM, Mello MAR, Boschero AC, Saad MJA, Velloso LA (1997) Glucose-Induced Insulin Secretion Is Impaired and Insulin-Induced Phosphorylation of the Insulin Receptor and Insulin Receptor Substrate-1 Are Increased in Protein-Deficient Rats. *J Nutr* 127:403–410 . doi: 10.1093/jn/127.3.403
29. Gueri M, Gurney JM, Jutsum P (1980) The Gomez classification. Time for a change? *Bull World Health Organ* 58:773–7
30. Lopes T de S, Quintana HT, Bortolin JA, Matos Alves PH, Bolina Matos R de S, Liberti EA, Oliveira F de (2017) Protein Malnutrition Pre- and Postnatal and Nutritional Rehabilitation Modulates the Morphology of Muscle Fibers in Wistar

Rats. *J Diet Suppl* 14:278–287 . doi: 10.1080/19390211.2016.1212960

31. Pertille A, Moura KF, Matsumura CY, Ferretti R, Ramos DM, Petrini AC, Oliveira PC, Silva CA, Pertille A, Moura KF, Matsumura CY, Ferretti R, Ramos DM, Petrini AC, Oliveira PC, Silva CA (2016) Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. *Brazilian J Biol* 77:83–91 . doi: 10.1590/1519-6984.10415
32. Jeronimo LC, Confortim HD, Centenaro LA, Brancalhão RMC, Pinheiro PFF, Matheus SMM, Torrejais MM (2016) Morphological and Morphometric Study of the Muscle Fibers and Neuromuscular Junctions of the Extensor Digitorum Longus in Aged Rats Submitted to Maternal Protein Restriction. *Int J Morphol* 34:396–403 . doi: 10.4067/S0717-95022016000100057
33. Pezolato VA, Forti G, Dias R, Cieslak F, Krinski K, Abreu MF de, Costa P, Silva CA da (2015) PERFIL HEMATOLÓGICO DE RATOS SUBMETIDOS A DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL. *BIOMOTRIZ* 9:
34. Goto K, Ishii N, Mizuno A, Takamatsu K (2007) Enhancement of fat metabolism by repeated bouts of moderate endurance exercise. *J Appl Physiol* 102:2158–2164 . doi: 10.1152/jappphysiol.01302.2006
35. Nassis GP, Papantakou K, Skenderi K, Triandafillopoulou M, Kavouras SA, Yannakoulia M, Chrousos GP, Sidossis LS (2005) Aerobic exercise training improves insulin sensitivity without changes in body weight, body fat, adiponectin, and inflammatory markers in overweight and obese girls. *Metabolism* 54:1472–1479 . doi: 10.1016/J.METABOL.2005.05.013
36. Wall BT, Morton JP, van Loon LJC (2015) Strategies to maintain skeletal muscle mass in the injured athlete: Nutritional considerations and exercise mimetics. *Eur J Sport Sci* 15:53–62 . doi: 10.1080/17461391.2014.936326
37. Avci P, Nyame TT, Gupta GK, Sadasivam M, Hamblin MR (2013) Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review. *Lasers Surg Med* 45:349–57 . doi: 10.1002/lsm.22153
38. Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM (2006) Gc-globulin: roles in response to injury. *Clin Chem* 52:1247–53 . doi: 10.1373/clinchem.2005.065680
39. Garrett WE, Kirkendall DT (2000) Exercise and sport science. Lippincott Williams & Wilkins
40. Alaverdashvili M, Li X, Paterson PG (2015) Protein-Energy Malnutrition

Causes Deficits in Motor Function in Adult Male Rats. *J Nutr* 145:2503–2511 . doi: 10.3945/jn.115.216382

41. Alves AP, Dâmaso AR, Dal Pai V (2008) Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos. *J Pediatr (Rio J)* 84:264–271 . doi: 10.1590/S0021-75572008000300013

42. KNOCHER JP, DOTIN LN, HAMBURGER RJ (1974) Heat Stress, Exercise, and Muscle Injury: Effects on Urate Metabolism and Renal Function. *Ann Intern Med* 81:321 . doi: 10.7326/0003-4819-81-3-321

43. Toscano AE, Manhães-de-Castro R, Canon F (2008) Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition* 24:270–278 . doi: 10.1016/j.nut.2007.12.004

44. Zhang K-R, Liu H-T, Zhang H-F, Zhang Q-J, Li Q-X, Yu Q-J, Guo W-Y, Wang H-C, Gao F (2007) Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. *Apoptosis* 12:1579–1588 . doi: 10.1007/s10495-007-0090-8