

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA  
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**HELENITA ANTONIA DE OLIVEIRA**

**REPERCUSSÃO DO PRÉ E PÓS-CONDICIONAMENTO  
MUSCULAR ESQUELÉTICO COM LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE EM MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESÃO E  
INFLAMAÇÃO EM RATAS SUBMETIDAS À UMA SESSÃO DE  
EXERCÍCIO RESISTIDO**

**São Paulo, SP**

**2016**

**HELENITA ANTONIA DE OLIVEIRA**

**REPERCUSSÃO DO PRÉ E PÓS-CONDICIONAMENTO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM MARCADORES  
BIOQUÍMICOS DE LESÃO E INFLAMAÇÃO EM RATAS SUBMETIDAS A  
UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO RESISTIDO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho,  
para obtenção do título de Mestre  
em Biofotônica aplicada às  
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Andrey  
Jorge Serra

**São Paulo, SP**

**2016**

***Oliveira, Helenita Antonia de.***

***Repercussão do pré e pós-condicionamento muscular esquelético com laser de baixa intensidade em marcadores bioquímicos de lesão e inflamação em ratas submetidas a uma sessão de exercício resistido. / Helenita Antonia de Oliveira.***

***56 f.***

***Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.***

***Orientador (a): Prof. Dr. Andrey Jorge Serra.***

***1. LBI. 2. Fotobiomodulação. 3. Lesão muscular. 4. Marcadores de dano muscular.  
5. Inflamação. 6. Ratas.***

***I. Serra, Andrey Jorge. II. Título.***

***CDU615.831***

São Paulo, 15 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: HELENITA ANTONIA DE OLIVEIRA

Titulo da Dissertação: "Repercussão do pré e pós-condicionamento muscular esquelético com laser de baixa intensidade em marcadores bioquímicos de lesão e inflamação em ratas submetidas a uma sessão de exercício resistido"

Presidente. PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. AYLTON JOSE FIGUEIRA JUNIOR



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Nove de Julho pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao Prof. Dr. Andrey Jorge Serra pela dedicação e paciência na minha orientação.

Ao Prof. Dr. Paulo Tucci por possibilitar o aprendizado no seu laboratório e pelas orientações científicas.

A Capes e Fapesp pelo apoio financeiro.

Ao Ednei, Flávio e todos amigos do laboratório de Fisiologia Cardíaca da Unifesp, pelo aprendizado, paciência e amizade.

Ao Márcio e Giuliano do laboratório de Biologia celular e molecular da Uninove.

E a todos meus amigos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Estudos experimentais e clínicos demonstraram efeitos positivos do laser de baixa intensidade (LBI) na redução de marcadores de danos muscular e perfil inflamatório, pós exercício. **Objetivo:** Analisar o efeito da aplicação do LBI (830 nm) prévio e posterior a sessão de exercício resistido, em marcadores bioquímicos de lesão e inflamação em ratas. **Métodos:** 99 ratas Wistar foram divididas em cinco grupos: Ctr (n=12) - animais que não receberam energia; 2J, 4J e 8J (n=12) - animais que receberam 2J, 4J e 8J de energia, previamente ao esforço físico; 4J-pós (n=8) -animais que receberam 4J de energia após exercício. O LBI foi aplicado no músculo gastrocnêmio bilateralmente. Imediatamente após a irradiação, os animais foram submetidos à uma sessão de exercício, que consistiu em quatro subidas na escada transportando a carga máxima. O grupo 4J-pós recebeu irradiação imediatamente após a sessão de exercício. Foi coletado sangue antes, imediatamente e 24 horas após a sessão de exercício resistido, para dosagens séricas de creatino quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e lactato. Na sequência, os animais foram eutanasiados e o músculo gastrocnêmio direito coletado para análise de expressão gênica de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1, CINC-1. **Resultados:** Aplicação prévia do LBI atenuou os níveis de lactato sanguíneo e atividade enzimática da CK e LDH, imediatamente pós-exercício, no grupo 4J em relação aos níveis de repouso. Após 24h, esses efeitos não diferiram nos níveis de CK, a LDH manteve-se elevada em todos os grupos. Na expressão gênica, houve redução no grupo 4J na concentração de IL-6 (p<0,05); IL-1 $\beta$ , CINC-1 e MCP-1 (p<0,001) imediatamente pós-exercício em relação ao grupo controle. Após 24h esse efeito foi encontrado no TNF- $\alpha$ , IL-6 (p<0,05) e MCP-1 (p<0,01). Na aplicação de 4J pós-exercício os níveis de CK e LDH foram menores somente na análise de 24h. Efeito encontrado também nas citocinas IL-1 $\beta$ , CINC-1, IL-10 (p<0,0001) e MCP-1 (p<0,02), que tiveram redução em relação ao grupo controle. **Conclusão:** Os resultados indicam que o LBI aplicado pré ou pós exercício foi eficaz em reduzir marcadores de lesão muscular e atenuar a inflamação, sendo que os melhores efeitos foram alcançados com a irradiação de 4 J.

**Palavras-chave:** LBI; fotobiomodulação; lesão muscular; marcadores de dano muscular; inflamação; ratas.

## ABSTRACT

Experimental and clinical studies have demonstrated positive effects of low level laser therapy (LLLT) on the reduction of muscle damage markers and inflammatory profile, post exercise. **Objective:** To analyze the effect of the application of LLLT (830 nm) before and after the resistance exercise session, in biochemical markers of muscle injury and inflammation in rats. **Methods:** 99 Wistar rats were divided into five groups: Ctr (n = 12) - animals that received no energy; 2J, 4J and 8J (n = 12) - animals that received 2J, 4J and 8J of energy, prior to physical exercise; 4J-post (n = 8) - animals that received 4J of energy post-exercise. LLLT was applied to the gastrocnemius muscle bilaterally. Instantly post irradiation, the animals were submitted a single exercise session, which consisted of four climbs on the ladder carrying the maximum load. The 4J-post group received irradiation instantly post the exercise session. Blood was collected before, instantly and 24 hours after the resistance exercise session, for serum creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and lactate. Then, the animals were euthanized and the right gastrocnemius muscle was collected for analysis of gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1, CINC-1 inflammatory cytokines. **Results:** Previous application of LLLT attenuated blood lactate levels and enzymatic activity of CK and LDH, instantly post exercise, in the 4J group in relation to resting levels. Post 24h, these effects did not differ in CK levels, LDH remained high in all groups. In the gene expression, there was reduction in the 4J group at the concentration of IL-6 (p <0.05); IL-1 $\beta$ , CINC-1 and MCP-1 (p <0.001) instantly post exercise in relation to the control group. Post 24 h this effect was found on TNF- $\alpha$ , IL-6 (p <0.05) and MCP-1 (p <0.01). In the 4J post exercise the CK and LDH levels were lower only in the 24h analysis. Effect also found on cytokines IL-1 $\beta$ , CINC-1, IL-10 (p <0.0001) and MCP-1 (p <0.02), which had a reduction in relation to the control group. **Conclusion:** The results indicate that LLLT applied prior or post exercise was effective in reducing muscle injury markers and attenuating inflammation, and the best effects were achieved with 4 J irradiation.

Keywords: LLLT; Photobiomodulation; muscle injury; muscle damage markers; inflammation; rats

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. Contextualização .....   | 01 |
| 2. Objetivo .....   | 06 |
| 2.1. Objetivos específicos .....  | 06 |
| 3. Material e Métodos .....   | 07 |
| 3.1. Animais de Experimentação .....  | 07 |
| 3.2. Desenho experimental .....   | 07 |
| 3.3. Coleta de sangue .....   | 07 |
| 3.4. Aplicação de LBI .....   | 08 |
| 3.5. Teste de carga máxima e exercício resistido .....  | 09 |
| 3.6. Eutanásia e coleta de materiais biológicos .....   | 10 |
| 3.7. Dosagens sérica de lactato .....   | 11 |
| 3.8. Dosagens sérica de CK .....  | 11 |
| 3.9. Dosagens sérica de LDH .....   | 11 |
| 3.10 Extração de RNA total do músculo gastrocnêmio .....                                      | 11 |
| 3.11. RT-PCR quantitativo em tempo real (Real-Time RT-PCR) .....                              | 12 |
| 3.11.1. Tratamento do RNA total .....   | 12 |
| 3.11.2. Transcrição reversa (RT) .....  | 12 |
| 3.11.3. Reação de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real (Real-Time PCR) .....           | 13 |
| 3.11.4. Quantificação de expressão do RNAm .....  | 14 |
| 3.12. Análise histomorfométrica .....   | 15 |
| 3.13. Análise estatística .....   | 16 |
| 4. Resultados .....   | 17 |
| 5. Discussão .....  | 18 |
| 6. Conclusão .....  | 22 |
| 7. Referências bibliográficas .....   | 23 |
| 8. Anexos .....   | 53 |
| 8.1. Termo de ciência do Comitê de ética para uso de animais (Uninove) .                      | 53 |
| 8.2. Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no uso de animais da UNIFESP/HSP .....      | 54 |
| 8.3. Submissão do artigo à revista Scandinavian Journal of Medicine & Science in sports ..... | 56 |

## **LISTA DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1-Processo inflamatório .....       | 02 |
| FIGURA 2- Desenho experimental.....        | 08 |
| FIGURA 3- Pontos de aplicação do LBI ..... | 09 |
| FIGURA 4- Estudo piloto .....              | 10 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ATP- Trifosfato de adenosina

CK- creatino quinase

CINC-1-proteína quimiotática de neutrófilos

DAB- Diaminobenzidina

DNA -ácido desoxirribonucleico

IL-1 $\beta$ - interleucina 1 beta

IL-6- interleucina 6

IL-10- interleucina 10

LDH- lactato desidrogenase

LBI- laser de baixa intensidade

MCP-1- proteína quimiotática de monócitos

mW- miliwatts

nm- nanómetro

PBS- tampão fosfato salino

PCR- reação em cadeia polimerase

RNA- ácido ribonucleico

RNAm- RNA mensageiro

RT- transcrição reversa

$\mu$ L- microlitro

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

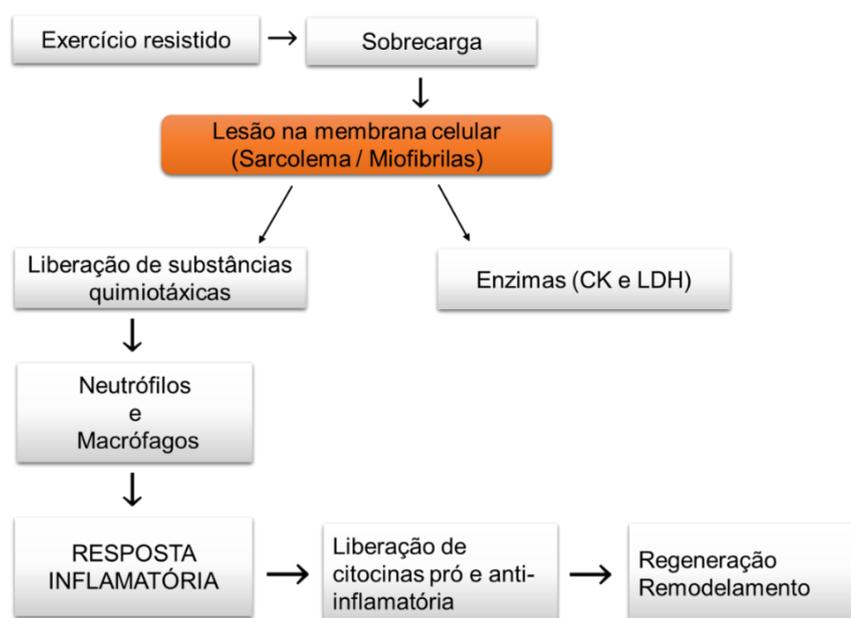
É consenso que o desempenho muscular esquelético constitui um dos principais determinantes para obtenção de resultados positivos na prática esportiva e competições. Neste cenário, a otimização de força, potência e resistência muscular perfazem alvo da prescrição e monitoramento de treinamento físico. Relata-se, porém, que aquém da melhora de desempenho muscular residem as alterações fisiológicas e estruturais deletérias inerentes as sessões de exercícios<sup>1,2,3</sup>. Tal situação é particularmente aplicável em intervenções que requeiram desenvolvimento de força máxima, em que prejuízos de desempenho e atraso na recuperação muscular pós-exercício são evidentes<sup>4,5,6</sup>.

Dentre os desequilíbrios homeostáticos promovidos pelo exercício de intensidade alta, a lesão muscular necrótica desperta particular interesse, em que o rompimento do sarcolema resulta em extravasamento das enzimas creatino quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) para corrente sanguínea<sup>7</sup>. Assim, o teor plasmático de CK e LDH é corriqueiramente utilizado como marcador indireto de dano muscular esquelético induzido pelo exercício<sup>8</sup>. A análise sérica da CK, por exemplo, é costumeiramente utilizada como marcador de dano muscular após diferentes exercícios de força máxima<sup>7,4,9</sup>. O emprego da dosagem de LDH é mais utilizado na identificação de lesões tardias ao esforço.

A reação à lesão tecidual culmina em alterações vasculares e hemodinâmicas que favorecem a migração de células inflamatórias para o sítio da lesão<sup>10</sup>. De fato, há aumento da infiltração muscular de neutrófilos e macrófagos para desencadear uma série de eventos organizados de forma a promover a reparação tecidual. Primeiramente, os neutrófilos removem os fragmentos celulares danificados<sup>11,12</sup> por meio da liberação de proteases lisossomais que degradam as proteínas locais e, da ativação da enzima mieloperoxidase<sup>12</sup>. Em seguida, macrófagos perpetuam a fagocitose das células ou componentes celulares desnecessários para homeostasia muscular<sup>10,11,12</sup>. A infiltração tecidual de neutrófilos ocorre dentre 4 a 6 horas pós-exercício e sua concentração permanece elevada por até 24 horas após lesão, enquanto que a infiltração macrófagica perdura de 1 a 14 dias após lesão, dependendo da extensão da lesão<sup>13</sup>.

A ação de neutrófilos e macrófagos ocorre concomitantemente à liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias<sup>11</sup>. Enquanto as citocinas pró-inflamatórias culminam em intensificação do processo inflamatório, as citocinas anti-inflamatórias atuam de maneira inversa, em um processo de regulação fundamental para o reparo da lesão<sup>14,12</sup>. Destaque-se a ação da interleucina 8 (IL-8), cuja ação está intimamente relacionada à atração quimiotática de neutrófilos e, por conseguinte, no processo reparatório em geral. É importante mencionar que a IL-8 não é produzida em ratos e, nesta espécie, há produção da CINC-1 (citocina quimiotática de neutrófilos), sendo homóloga a IL-8 em humanos<sup>15</sup>. Toma-se como exemplo a Figura 1, em que há ilustração dos eventos biológicos existentes durante e após o exercício resistido induzido por estresse mecânico.

Há evidências sólidas que a resposta inflamatória aguda pós-exercício aumenta o número de leucócitos no tecido muscular e circulação sistêmica. Não obstante, tal processo parece ser finalmente regulado pelas características do exercício (volume, intensidade e duração) e o grupo muscular envolvidos durante a atividade<sup>13</sup>.



**Figura 1.** O exercício resistido gera sobrecarga da musculatura esquelética ocasionando micro lesões musculares (sarcolema e miofibrilas). Há liberação de enzimas intracelulares (CK e LDH) para corrente sanguínea e substâncias quimiotáticas são liberadas no local da injúria atraindo neutrófilos e macrófagos, dando início ao processo inflamatório. Estas células vão remover detritos celulares (processo de fagocitose), com isso aumenta a produção de citocinas pró e anti-inflamatória levando a regulação da inflamação, podendo contribuir na regeneração e remodelamento do tecido muscular

O fato de lesões musculares ocasionadas por exercícios de força durante a prática esportiva serem a principal causa do afastamento de atletas dos treinamentos e competições despertou interesse por ferramentas que, de alguma forma, possam proporcionar menor incidência e melhor resposta às lesões decorrentes do exercício<sup>11,16</sup>. Assim, a busca por intervenções que retardem o desenvolvimento de fadiga, melhorem o desempenho muscular e acelerem o processo de recuperação muscular constituem objeto habitual de investigação. Diversas propostas como massagens, banhos de contraste (imersão quente e frio)<sup>8,13,17</sup>, crioterapia, ultra-som<sup>8,11</sup>, câmara hiperbárica<sup>8,13</sup>, farmacoterapia anti-inflamatória<sup>8,10,11,13</sup>, acupuntura e homeopatia<sup>13</sup> são consideradas como perspectiva de potencializar o desempenho muscular e otimizar o processo de reparo tecidual.

O laser de baixa intensidade (LBI) tem recebido certo destaque<sup>8,11,13,17</sup>. O termo “Laser” significa amplificação de luz por emissão estimulada de radiação<sup>18,19</sup>. Desenvolvido na década de 60, o LBI possui propriedades especiais, como monocromaticidade, coerência e baixa divergência<sup>19,20</sup>. A luz é formada por ondas eletromagnéticas visíveis ou não ao olho nu, que podem ser categorizadas conforme comprimento de onda e tipos de produtos utilizados na sua produção. É chamado de “laser de baixa intensidade (LBI)” o laser que consiste em luzes com comprimentos de ondas entre 600 e 1000 nm, densidades de potência de 5 a 50 mW/cm<sup>2</sup> e densidade de energia dependente da área e tempo de exposição<sup>20</sup>. Embora não exista consenso absoluto na literatura, atualmente aceita-se que os efeitos do LBI derivam da interação de fótons da radiação do laser em doses otimizadas (janela terapêutica) com receptores específicos da mitocôndria, levando ao aumento da função mitocondrial, síntese de ATP, RNA e proteínas.

No cenário da reparação tecidual após exercício físico, deriva do uso do LBI o processo de aceleração da regeneração muscular, o despertar de efeitos anti-inflamatórios e ação analgésica em exercícios aeróbios de intensidade alta<sup>9</sup>. Assim, há registros que a aplicação do LBI culmina em modulação benéfica de marcadores bioquímicos de recuperação<sup>6</sup> e inflamação<sup>18</sup> muscular e, em algumas circunstâncias, proteção do dano tecidual<sup>19</sup>. Reporta-se que estes achados experimentais são traduzidos para humanos, como exemplo, cita-se o estudo de Dos Reis et al.<sup>8</sup>. Os autores observaram que o LBI, quando aplicado

no quadríceps femoral após fadiga induzida por estiramentos musculares sucessivos, reduziu significativamente as concentrações séricas de lactato e CK em comparação a sujeitos não irradiados. Tais benefícios do LBI podem ser atribuídos a [1] aumento da microcirculação e função mitocondrial<sup>17</sup>, [2] redução do perfil pró-inflamatório<sup>18</sup> e [3] aumento da capacidade antioxidante<sup>6</sup>.

As informações precedentes são sugestivas de que a aplicação do LBI após o exercício físico pode acelerar o reparo muscular, convergindo em melhora do desempenho nas seções de treinamento subsequentes. Menciona-se, ainda, a extensão das ações do LBI como alternativa para pré-condicionar a musculatura esquelética, ou seja, aplicado previamente ao exercício. Novamente, postula-se como benefícios do LBI a melhoria de desempenho e do processo de regeneração tecidual para exercícios musculares localizados<sup>21,22,23,24</sup>. A solidez desta informação pode ser pautada em estudo de Baroni et al.<sup>25</sup> conduzido em indivíduos submetidos à fadiga por exercício excêntrico. Os investigadores observaram que a aplicação prévia do LBI de 810 nm (200 mW de potência) resultou em atenuação da concentração sérica de CK e LDH durante 48 horas de recuperação. Estes achados foram acompanhados de melhora do desempenho, representado por maiores níveis de contração voluntária máxima. Acresça-se o estudo de De Marchi et al.<sup>26</sup>, em que a aplicação do LBI pré-exercício aeróbio de intensidade progressiva melhorou o desempenho, reduziu estresse oxidativo e atenuo o dano tecidual. Resultados similares foram divulgados por Leal Júnior et al.<sup>27</sup>, em que atletas de vôlei e futebol submetidos a teste de *Wingate* exibiram redução dos níveis séricos de CK e lactato com aplicação prévia do LBI.

Embora os achados em humanos sejam animadores para aceitar o uso do pré-condicionamento com LBI como ferramenta útil para potencializar o desempenho e acelerar o processo de recuperação muscular, certas limitações devem ser consideradas: [1] muitos estudos são representativos de exercícios resistidos localizados, o que limita a aplicabilidade para modalidades esportivas que requeiram grandes grupos musculares; [2] os testes de carga máxima podem ser limitados por períodos de adaptabilidade impróprios<sup>28</sup>; [3] em atletas, o estágio de periodização, o tipo de treinamento realizado e a experiência com a modalidade esportiva podem ser de difícil controle. De fato, estas limitações

podem afetar o poder do estudo e, por conseguinte, a interpretação segura dos resultados acerca dos benefícios do LBI.

Os inconvenientes que vigoram em estudos conduzidos em humanos podem ser pormenorizados em condições experimentais, em que a utilização de roedores se destaca como modelo corriqueiro na literatura. Ao considerar a análise do papel do LBI, a quantidade de informações é ainda pequena, porém, sinalizam para benefícios da fototerapia sobre os seguintes parâmetros: [1] concentrações séricas de lactato, creatina quinase e citocinas pró-inflamatórias<sup>6,18</sup>; [2] apoptose celular<sup>9</sup>; [3] mitose muscular esquelética<sup>6</sup>.

A respeito dos estudos experimentais, três condições devem ser mencionadas: [1] o papel do LBI foi avaliado primordialmente em exercícios com características aeróbias, sendo escassa a repercussão para exercícios anaeróbios<sup>18,29,30</sup>. Neste cenário, nós encontramos apenas um estudo que utilizou LBI de 808 nm durante um programa de exercício resistido de cinco semanas em ratos<sup>6</sup>. A irradiações foram conduzidas após cada sessão de exercício, com objetivo de caracterizar as repercussões do LBI no remodelamento muscular. Os autores observaram que a fototerapia resultou em melhores níveis de lactato sanguíneo e glicogênio muscular, que foram acompanhados de aumento da área de secção transversa da fibra. Infelizmente, a influência do LBI em marcadores de recuperação não foi explorada neste estudo; [2] as irradiações foram variavelmente conduzidas antes ou após o exercício físico; [3] o parâmetro de irradiação ótimo para melhorar o desempenho e a recuperação muscular pós-exercício de carga máxima ainda não foi determinado.

Pautados nas informações mencionadas acima, nós estruturamos um projeto de pesquisa para analisar a repercussão da aplicação do LBI prévio e posterior a uma sessão de exercícios resistidos realizada com carga máxima em ratos. Nós formulamos a hipótese de que o LBI poderia reduzir a lesão e inflamação da musculatura esquelética pós sessão de exercício e que os benefícios poderiam ser dependentes da dose.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Analisar o efeito da aplicação do LBI prévio e posterior a uma sessão de exercício resistido.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do LBI sobre marcadores de lesão muscular e inflamação.
- Determinar o parâmetro de irradiação com melhores efeitos sobre os indicadores de lesão e inflamação muscular.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais de Experimentação**

Foram utilizadas 99 ratas Wistar com 12 semanas de idade, pesando entre 200 e 250g. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em uso de animais da Universidade Federal de São Paulo- SP (8868250615). Os animais foram randomizados por meio de sorteio e distribuídos em cinco grupos: Controle (Ctr, n=12) - animais que passaram pelo mesmo protocolo de exercício, mas não receberam energia; L 2J (n=12) - animais que receberam 2J de energia; L 4J (n=12) - animais que receberam 4J de energia; L 8J (n=12) - animais que receberam 8 J de energia, ambos foram irradiados pré-exercício; L 4J-pós (n=8) - animais que receberam 4J de energia pós exercício. A dosagem foi definida com base na melhor efetividade de 4J em estudos de pré-condicionamento. Os animais foram mantidos no biotério sob condições controladas de umidade do ar (50% - 60%), luminosidade (12h claro/12h escuro) e temperatura ambiente (22°C - 25°C). Os animais foram alocados em caixas plásticas, em grupos de no máximo 4 animais. Todos os animais tiveram acesso livre a água e ração.

#### **3.2 Desenho experimental**

O estudo foi estruturado para compor duas fases experimentais:

Fase 1, direcionada para analisar a repercussão da aplicação do LBI prévia ao exercício resistido;

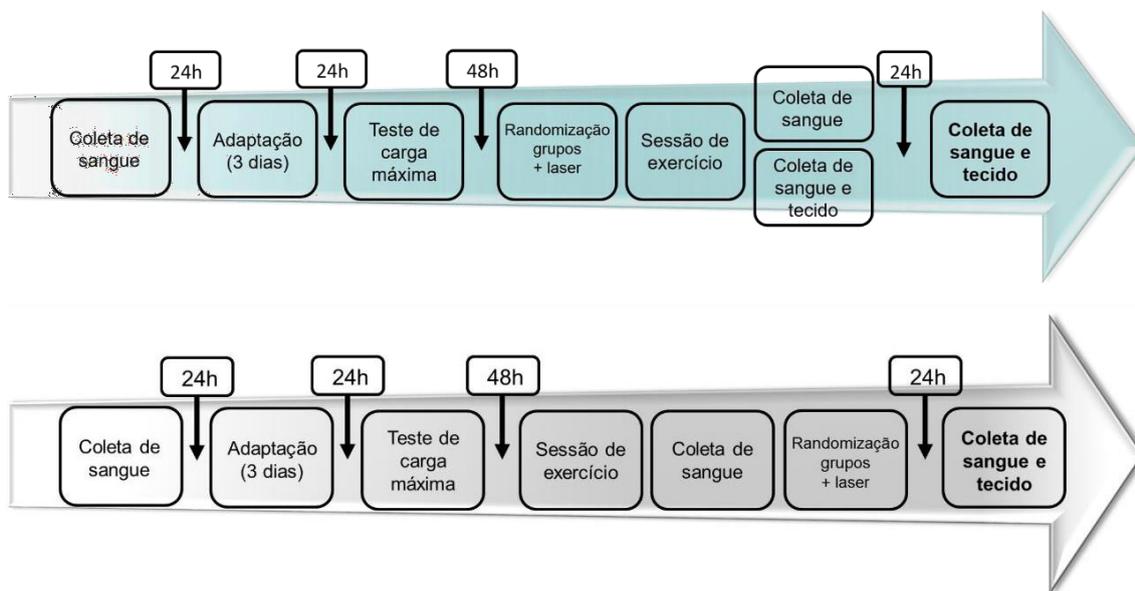
Fase 2, direcionada para analisar a repercussão da aplicação do LBI após o exercício resistido.

O desenho experimental completo do estudo pode ser visualizado na Figura 2.

#### **3.3 Coleta de sangue**

Os animais foram anestesiados com Isoflurano 5% em dose de manutenção de 2%. Com auxílio de capilares de vidro procedeu-se com a coleta de 1,5 ml de sangue da fossa ocular. As coletas de sangue foram realizadas antes do protocolo de exercício resistido (basal), imediatamente e 24 horas após o exercício resistido (Figura 2). Após cada coleta, foi administrado soro fisiológico 0,9% (SF0,9%) - 2mL intraperitoneal para reposição da volemia. O sangue foi centrifugado por 12 minutos a 4000 rpm e as amostras de soro e plasma foram

separadas e armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.



**Figura 2.** Desenho experimental do estudo, contemplando as intervenções e coleta de material biológico. A Fase 1 compreende a aplicação do LBI prévia ao exercício. Na Fase 2, os animais foram irradiados imediatamente após o exercício resistido.

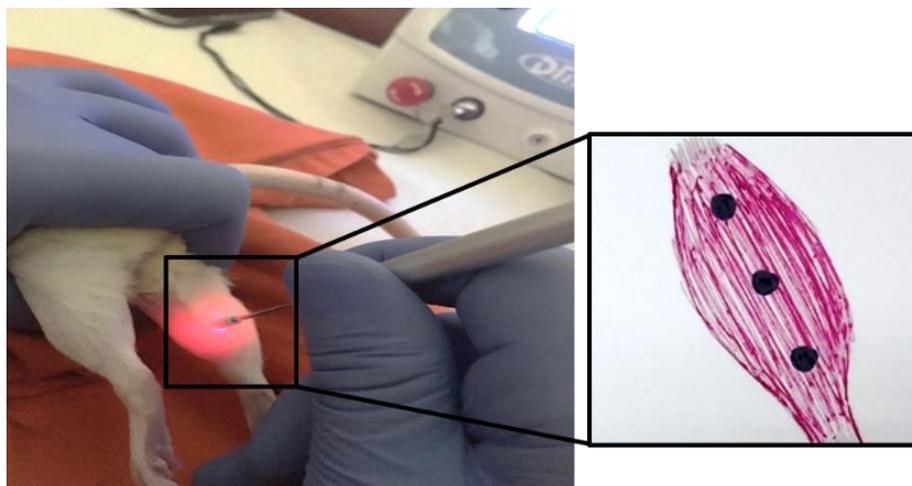
### 3.4 Aplicação do LBI

Utilizou-se o equipamento DMC Thera Lase (São Carlos, SP, Brasil), no qual foi programado para utilização com os parâmetros de irradiação visualizáveis na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros de irradiação com LBI.

| Grupos experimentais | Comprimento de onda (nm) | Potência de saída (mW) | Densidade de potência ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) | Feixe do laser ( $\text{cm}^2$ ) | Densidade de energia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) | Energia por ponto de irradiação (J) | Tempo de exposição (s) |
|----------------------|--------------------------|------------------------|--|----------------------------------|---|-------------------------------------|------------------------|
| <b>Ctrl</b>          | ----                     | ---                    | ---  | ---                              | ---   | ---                                 | 40                     |
| <b>2J</b>            | 830                      | 100                    | 3,57   | 0,028                            | 144   | 2                                   | 20                     |
| <b>4J</b>            | 830                      | 100                    | 3,57   | 0,028                            | 144   | 4                                   | 40                     |
| <b>8J</b>            | 830                      | 100                    | 3,57   | 0,028                            | 144   | 8                                   | 80                     |

O LBI foi aplicado transcutaneamente em três pontos distintos do músculo gastrocnêmio (Figura 3). As irradiações foram realizadas por contato direto da ponteira na pele sobre os dois membros inferiores de cada animal, totalizando seis pontos de irradiações.

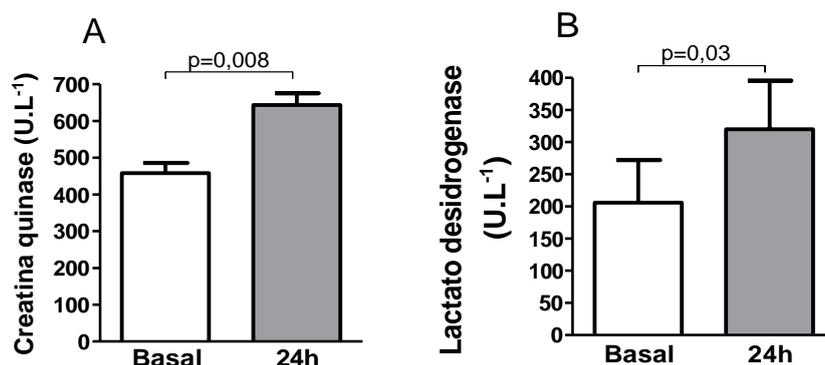


**Figura 3.** Pontos de aplicação do LBI no músculo gastrocnêmio.

### **3.5 Teste de carga máxima e exercício resistido**

O protocolo de teste utilizado no presente estudo foi previamente padronizado por Sanches et al.<sup>31</sup>, onde foram encontrados efeitos do treinamento resistido em parâmetros antropométricos, metabólicos e cardiovasculares. Sendo assim, hipotetizamos que uma única sessão desse modelo de exercício, com a adaptação de sua intensidade, poderia promover alterações musculares propícias para os desfechos analisado em nosso estudo. O protocolo consiste na utilização de escada adaptada para roedores com 54 degraus verticais (espaçamento de 0,5 cm entre os degraus e 80° de inclinação). Os animais passaram por duas fases: fase de adaptação e fase de determinação da carga máxima. Na fase de adaptação, os animais realizaram três subidas em direção a caixa escura (20 x 20 x 20 cm) que foi montada no topo da escada, partindo de três pontos diferentes da escada: parte superior, média e inferior. Procedeu-se com repouso de dois minutos entre cada subida. Os animais repetiram o procedimento por três dias consecutivos. Para a determinação da carga máxima, os animais foram pesados e as cargas (pesos de pesca) foram presas na porção proximal da cauda por meio de fita autoadesiva. Os animais iniciaram o teste transportando cargas correspondente a 75% do peso corpóreo.

Completada a subida e, após o repouso de dois minutos na caixa escura, o procedimento foi repetido sendo acrescido 15% do peso corpóreo até que o animal não conseguisse completar a subida até o topo da escada. A carga atingida na última subida completada com sucesso foi definida como a carga máxima. Os animais realizaram única sessão de exercício que consistiu em quatro séries, permitindo a realização de 8 a 12 movimentos na escada. O repouso entre as séries foi de dois minutos. A base para este volume e intensidade de exercício é pautada em estudo piloto de nosso grupo, em que se observou aumento significativo da concentração sérica da CK e lactato desidrogenase LDH após 24 horas de realização da sessão de exercício (Figura 4). O protocolo de exercício foi considerado apropriado para induzir micro lesão muscular e, assim, analisar a repercussão do LBI. O tempo despendido para cada animal atingir o topo da escada foi registrado para cálculo da velocidade média de subida, um indicador de desempenho.



**Figura 4.** Dados de estudo piloto para caracterizar os efeitos de 4 subidas em escada com carga máxima sobre os níveis sérios de creatina quinase (Painel A) e lactato desidrogenase (Painel B). Os dados foram analisados com teste *t* de *Student* pareado e são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP).

### 3.6 Eutanásia e coleta de materiais biológicos

Os animais foram eutanasiados com superdosagem de Uretana (4,8 g kg<sup>-1</sup> *i.p*)<sup>32</sup>. O músculo gastrocnêmio da pata direita foi retirado e cortado transversalmente, com a porção distal conservada em formol tamponado 10% e a porção proximal congelada em freezer -80°C. Os animais que receberam irradiação prévia ao exercício resistido, a coleta do músculo foi realizada em dois momentos: imediatamente e 24 horas após o exercício resistido. Nos animais que receberam irradiação pós-exercício a coleta do músculo foi realizada 24

horas após a sessão de exercício.

### **3.7 Dosagens séricas de lactato**

O lactato foi analisado por ensaio colorimétrico com quite LACTATO (REF.: 10.018.00; Biotécnica, MG, Brasil). Para tanto, empregou-se 10  $\mu\text{L}$  de plasma em 1 mL de reagente para homogeneização e pré-aquecimento em banho maria à 37°C por 5 minutos. Logo após, 200  $\mu\text{L}$  do homogenato foram pipetados em duplicada em placa de 96 poços para leitura da reação em 546 nm em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA).

### **3.8 Dosagens séricas de CK**

Para a determinação da atividade enzimática da creatino quinase utilizou-se quite CKNAC (REF.: 11.002.00; Biotécnica, MG, Brasil) e amostra de soro. O reagente de trabalho foi preparado conforme instruções do fabricante e pré-aquecido em banho maria à 37°C durante 3 minutos. Seguiu-se com adição de 12  $\mu\text{L}$  de soro em 300  $\mu\text{L}$  de reagente de trabalho e adição de 200  $\mu\text{L}$  do homogenato em duplicata em placa de 96 poços. Após 2 minutos, realizou-se quatro leituras a 340 nm em intervalos de 1 minuto em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA).

### **3.9 Dosagens séricas de LDH**

A atividade enzimática da LDH foi analisada com quite DESIDROGENASE LÁCTICA (REF.: 11.004.00; Biotécnica, MG, Brasil). A solução de trabalho foi pré-aquecida em banho maria à 37°C por 3 minutos. Em seguida, 0,6  $\mu\text{L}$  de soro foi adicionado a 300  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho. Desta solução final, 200  $\mu\text{L}$  foram pipetados em duplicata em placa de 96 poços. Após 60 segundos, realizou-se quatro leituras a 340 nm em intervalos de 1 minuto em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA).

### **3.10 Extração de RNA total do músculo gastrocnêmio**

Os animais foram eutanasiados com superdosagem de Uretana (4,8 g  $\text{kg}^{-1}$  *i.p.*)<sup>32</sup>. O músculo gastrocnêmio da pata direita foi retirado e imediatamente após, as estruturas foram colocadas em tubos plásticos 2,0 ml e congelado em gelo seco. As amostras foram mantidas congelada em freezer -80°C até a

realização das análises. Os tecidos congelados (~100 mg) foram homogeneizados em 1 ml de TRIzol Reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (D-130 – Package 1, Wigger Hauser, Alemanha). O isolamento do RNA total foi realizado de acordo com as orientações do fabricante. Após a homogeneização, 200 µl de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 s. Em seguida, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram centrifugadas por 15 min, 12000 x g a 4°C. A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo plástico de 1,5 ml estéril, e foram adicionados 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 min, e novamente centrifugadas (12000 x g/4°C/10 min). Os sobrenadantes foram desprezados, e os “pellets” de RNA lavados com etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (12000 x g/4°C/5 min), e os sobrenadantes descartados. Os “pellets” secaram ao ar livre, sendo então ressuspensos com 30 µl de água DEPC. Os RNAs foram quantificados em espectrofotômetro (Eppendorf) com leitura em filtro de 260 nm. A integridade dos RNAs foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. As amostras que apresentarem integridade das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal foram consideradas íntegras e utilizadas nos experimentos de quantificação de expressão gênica.

### **3.11. RT-PCR quantitativo em tempo real (*Real-Time* RT-PCR)**

#### **3.11.1 Tratamento do RNA total**

Para a quantificação da expressão gênica foram utilizados os RNAs totais extraídos do músculo gastrocnêmio direito dos grupos experimentais. Para a eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1 µg de RNA total foi incubado com 1 unidade de DNase I/RNase Free (Invitrogen), 0,5 unidade de RNase OUT (Invitrogen), 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) e água DEPC, em uma reação de 13,5 µl. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 min, e à 95°C por 5 min, para inativação da DNase I.

#### **3.11.2 Transcrição reversa (RT).**

Logo após o tratamento com DNase I, foram realizadas as reações de

transcrição reversa (RT), para a síntese do cDNA. Ao RNA tratado foram adicionados 2 µl de tampão de incubação (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4, 20 mM e MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM), 1 unidade de transcriptase reversa MULV-RT (Invitrogen), 0,5 unidade de RNase-OUT (Invitrogen), 1 µl de oligonucleotídeos (dNTPs, 10 mM), 50 ng de RH e 1 µl de DTT (10 mM), em uma reação de 200 µl. As amostras foram 97 então submetidas às seguintes incubações: 20°C por 10 min, 42°C por 45 min, 95°C por 5 min. Após a reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20°C. Para garantir a efetividade do tratamento com a DNase, foram realizadas reações de RT sem a transcriptase reversa, como controle negativo, de RNAs tratados como acima descrito. Todas as amostras foram submetidas a este controle.

### 3.11.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real (Real-Time PCR)

A reação de polimerase em cadeia em tempo real (*Real-Time PCR*) combina a amplificação da PCR com detecção fluorescente automatizada, realizada com auxílio do aparelho de detecção de sequência Mastercycler ep realplex (Eppendorf). O sistema de detecção utilizado para a quantificação da expressão de RNAm de citocinas inflamatória foi o SYBR Green. Neste sistema, a molécula de SYBR Green interage com a fita dupla de DNA amplificada pela PCR, e emite uma fluorescência quando excitada por lâmpada de tungstênio-halogênio, e esta fluorescência é captada pelo aparelho de detecção. Este processo de excitação captação de fluorescência é realizado em cada ciclo de amplificação da PCR, fornecendo uma quantificação em tempo real das sequências dos genes-alvo. A reação de PCR em tempo real foi realizada da seguinte maneira: a 1,0 µl de cDNA, foram adicionados 0,5 µl de óligo iniciador sense (10 µM), 0,5 µl de óligo iniciador anti-sense (10µM), 7,5 µl de Master Mix 2X (Applied Biosystems) e água suficiente para 15 µl de reação. As amostras foram então incubadas a 95°C por 10 min, e passarão por 40 ciclos de incubações a 95°C por 15 s, e a 60°C por 1 min. Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de PCR foram:

- Fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ): sense 5`-  
AAATGGGCTCCCTCTATCAGTTC-3`, antisense: 5`-

TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3`- (número de acesso no GenBank: X66539);

- Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ): senso 5`-CAGGAAGGCAGTGTCCTCA-3`, antisenso 5`- GGGATTTTGTTCGTTGCTTGT-3`- (número de acesso no GenBank: M98820.1);
- Interleucina-6 (IL-6): senso 5`- TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3`, antisenso 5`-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3`-( número de controle no GenBank: E02522).
- Interleucina 10 (IL-10): senso 5`-TTGAACCACCCGGCATCTAC-3`, antisenso 5`-CCAAGGAGTTGCTCCCGTTA-3` - (número de acesso GenBank NM\_012854.2);
- Citocina quimiotática de neutrófilos (CINC-1): senso 5`- ACACTCCAACAGAGCACCAT-3`, antisenso: 5`- CTGACAGCGCAGCTCATTG-3 - (número de acesso no GenBank NM\_030845.1);
- Proteína quimiotática de macrófagos (MCP-1): senso 5`- GCCTGTTGTTACAGTTGCT-3`, antisenso: 5`- ATGAGTAGCAGCAGGTGAGTG-3` - (número de acesso no GenBank NM\_031530.1);
- Beta-actina: senso 5`- TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3`, antisenso 5`- ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3` - (número de acesso GenBank NM\_031144.3).

A detecção de fluorescência se dá automaticamente pelos filtros do aparelho, e é imediatamente transferida para o software de análise. Os experimentos foram realizados em duplicata. Como controles de especificidade de reação utilizamos dois parâmetros: presença de apenas um pico de fluorescência no protocolo de dissociação e ausência de qualquer tipo de amplificação nas reações com os controles negativos de transcrição reversa.

#### **3.11.4 Quantificação de expressão do RNAm**

A quantificação de RNAm de citocinas inflamatória foram analisadas como um valor relativo a referência interna, o RNAm da beta-actina. Os valores quantitativos de expressão do RNAm foram obtidos de um limiar arbitrário de

fluorescência, analisado na fase exponencial da curva de amplificação, sendo o ciclo limiar (Ct) calculado. Foram calculados os Cts de cada amostra, em cada reação, para os seis genes. Foi então calculado o Ct médio de cada amostra, e o cálculo de expressão relativa foi realizado por meio da subtração deste Ct médio de cada gene dos receptores de citocinas inflamatória do Ct médio do gene Beta actina, obtendo-se o  $\Delta$ Ct para cada receptor. Como não é usual a utilização da expressão relativa de um determinado gene em valores de  $\Delta$ Ct, devido às suas características logarítmicas, foi utilizado o parâmetro  $2^{-\Delta\Delta$ Ct para análise de expressão relativa do RNAm dos receptores de citocinas inflamatória tecidual.

### **3.12 Análise histomorfométrica**

As amostras do músculo gastrocnêmio foram mantidas previamente em formol tamponado a 10% por 72 horas. Procede-se com desidratação tecidual em soluções crescente de álcool etílico (70%, 80% e 90%) por 90 minutos cada, três passagens em álcool absoluto e Xilol, respectivamente. Após impregnação do tecido em parafina, os músculos foram clivados e incluídos transversalmente no bloco para obtenção de dois cortes de 5  $\mu$ m de espessura em micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram postados em lâminas sinalizadas de microscópio e mantidos repousando a 37°C por 12 horas. Para recuperação antigênica das lâminas foi utilizado solução de citrato pH 6,0 em panela de pressão (DAKO) durante 5 minutos a 125°C. Foi realizado o bloqueio da enzima peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3%, três vezes durante cinco minutos, em seguida lavado três vezes com água deionizada e uma vez com tampão fosfato salino (PBS). Logo após foi realizado bloqueio de proteínas inespecíficas com Protein Block (DAKO) por um período de 15 minutos e aplicado anticorpo primário mouse anti-rat CD68 – ab31630) na concentração 1:50 (Abcam, Tokyo, Japão). As lâminas foram incubadas em câmara úmida, overnight por período de 18 horas à 4°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS e ministrado o polímero universal, anti-mouse e anti-rabbit na concentração 1:1 (Histofine, Tokyo, Japão) por período de 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas três vezes em PBS e reveladas em Diaminobenzidina (DAB) durante cinco minutos. As lâminas foram contracoradas em Hematoxilina de Harris por um minuto. Logo

após, foram lavadas em água corrente, os cortes foram desidratados em soluções de álcool etílico crescente (70% 80%, 95% e 100%), três passagens de xilol e montadas com *Ervmount* (meio de montagem permanente - Erviegas).

Para avaliação e quantificação da presença de macrófagos no tecido, áreas de coloração positiva de cada amostra foram visualizadas e as imagens capturadas em microscópio com objetiva em 40 vezes (Leica DM/LS, Leica Microsystems Ltda., Germany) ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Solutions). As imagens digitalizadas dos tecidos foram analisadas com software específico (Leica QWin Plus V.3.2.0., Leica Microsystems Imaging Solutions Ltda., Cambridge, UK). Foram selecionados faixas na qual se obtinham os mesmos tons de cor (marrom) para uniformização das análises das amostras.

### **3.13 Análise estatística**

Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificação da distribuição Gaussiana dos dados. A comparação dos resultados entre os diferentes grupos foi realizada com ANOVA uma e duas vias e pós-teste de Kruskal-Wallis. Seguido de teste de post hoc (Bonferroni para dados paramétricos ou Dunn para dados não paramétricos). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA).

#### 4. RESULTADOS

**Artigo submetido no jornal:** Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports.

# **LOW-LEVEL LASER THERAPY PRIOR OR POST EXERCISE REDUCES MUSCLE DAMAGE AND INFLAMMATION WHEN USED AT A GOLD STANDARD DOSE**

Helenita Antonia de Oliveira<sup>1</sup>, Ednei Luiz Antonio<sup>2</sup>, Flávio André Silva<sup>2</sup>, Paulo de Tarso Camillo de Carvalho<sup>1</sup>, Regiane Feliciano<sup>1</sup>, Amanda Yoshizaki<sup>2</sup>, Stella de Souza Vieira<sup>2</sup>, Bruno Lemes de Melo<sup>2</sup>, Rodrigo Labat<sup>1</sup>, Ernesto Cesar Pinto Leal Junior<sup>1</sup>, Danilo Sales Bocalini<sup>3</sup>, José Antonio Silva Junior<sup>1,4</sup>, Paulo José Ferreira Tucci<sup>2</sup>, Andrey Jorge Serra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biophotonic, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Translational Physiology Laboratory and Physical Education and Aging Science Program, São Judas Tadeu University, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup> Medicine Program, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil.

## **Corresponding author:**

Andrey Jorge Serra

Rua Araurari 159,

03659-040 São Paulo, Brazil.

E-mail: andreyserra@gmail.com

## **ABSTRACT**

We studied whether the low-level laser therapy (LLLT) application prior or post to a resistance exercise bout could attenuate muscle injury and inflammation. Moreover, we determine a gold standard energy dose. For this purpose, female Wistar rats (n=96) were assigned into non-LLLT treated or LLLT treated groups. The phototherapy and/or placebo were performed prior (2J, 4J and 8J dose, respectively) or post (4J) resistance bout using DMC Laser Photon III of 808 nm. The resistance exercise consisted of four maximum load climbs with a 2-min time interval between each climb. The prior LLLT application did not induce improvement in climbs performance, but 4J dose resulted in a lower blood lactate concentration when compared to other groups. The 4J dose decreased creatine kinase and lactic dehydrogenase levels post-exercise independent of the prior/post-application. Moreover, prior/post-4J application to resistance exercise was superior to attenuate tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) as well as cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the skeletal muscle. Instantly and twenty-four hours post-exercise, compared to none-LLLT treated rats, 4J irradiated rats exhibited a decreased macrophage muscle infiltration. In conclusion, LLLT application prior or post resistance exercise can lead to improving muscle damage and inflammation. Moreover, injury and inflammatory environment in the muscle seemed to be optimized when a gold standard 4J dose is applied.

**Keywords:** muscle recovery, phototherapy, strength training.

## INTRODUCTION

Exercise represents the physical stress that transiently disrupts homeostasis, and the skeletal muscle is most directly affected. Studies have shown that exercise bout may induce tissue damage associated with a high inflammatory response (Tidball, 2005; Smith *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2013). In this regard, there is a robust body of evidence showing that prior or post-exercise low-level laser therapy (LLLT) may delay skeletal muscle fatigue and improve biochemical markers related to injury and recovery in animals (Silva *et al.*, 2015) and humans (Leal Junior *et al.*, 2008; Leal Junior, Lopes-Martins, Rossi, *et al.*, 2009; Leal Junior *et al.*, 2010). The reasons for these beneficial effects remain uncertain, but studies suggest that LLLT can attenuate boost of reactive oxygen species (Guaraldo *et al.*, 2016) and pro-inflammatory factors, including tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL-1 $\beta$ ), as well as increasing anti-inflammatory cytokines, such as interleukin 10 (IL-10) (Laraia *et al.*, 2012; Manchini *et al.*, 2014).

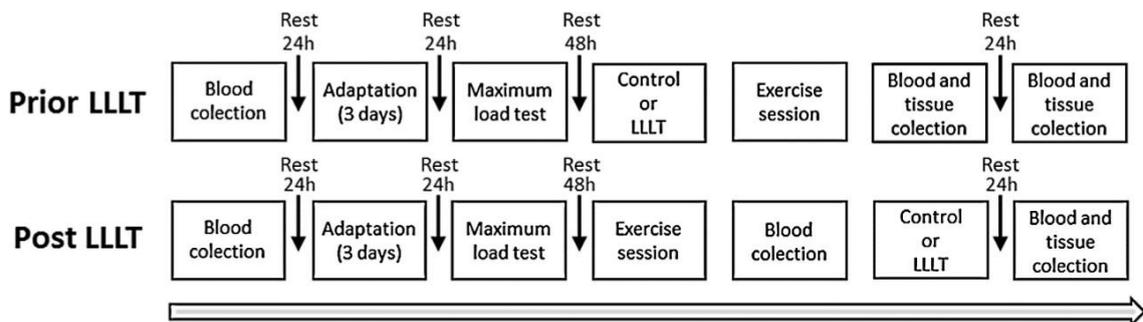
Although the above findings are encouraging to consider LLLT as an approach to relieve fatigue and accelerate post-exercise muscle recovery, some limitations show to be punctuated: many of the studies in humans have targeted laser irradiation on specific muscles, in which it can limit the perspective to sports modalities with multi-articular demands; maximum load tests may be limited by a poor familiarization (Bocalini *et al.*, 2013); periodization or experience training are factors that can bias the data mainly in athletes.

Biases in human studies show to be relieved under experimental conditions, in which the load, as well as volume of training and sample homogeneity, are easily controlled. In this regard, LLLT also has been shown to attenuate fatigue, injury, and muscle inflammation induced by exercise (Sussai *et al.*, 2010; Patrocínio *et al.*, 2013; Amadio *et al.*, 2015). However, most of the studies have only investigated LLLT repercussion in animals submitted to an aerobic exercise bout with irradiations carried out prior or post-exercise (Amadio *et al.*, 2015; Assis *et al.*, 2016; Guaraldo *et al.*, 2016). Thus, the role of LLLT in resistance exercise has not been reported. Moreover, considering that “therapeutic window” have pivotal implication for the LLLT effectiveness, energy dose is a parameter key to obtain positive results, while inadequate parameters will, at best, give zero results. In the present study, we hypothesized that the LLLT application prior or post to a resistance exercise session could attenuate skeletal muscle injury and inflammation and investigated whether the effects are dose dependents.

## METHODS

### *Ethics statement and experimental design*

All experimental procedures were performed in accordance by the standards of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The study protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committee from the Federal University of São Paulo, São Paulo – SP, Brazil (process: 8868250615). Ninety-six female Wistar rats, weighing 200-250 g and aged 12 weeks, were assigned to one of the following groups: Rats that were only submitted to resistance exercise bout (Ctr group). These animals were manipulated in the same way as those in the LLLT groups but with the equipment turned off; rats that were submitted to 2J, 4J and 8J of LLLT prior a resistance exercise bout, respectively. A second experimental set was carried out to evaluate the role of post-exercise LLLT application. Thus, we have used 4J because this energy level has provided better results on the analysis of the phototherapy prior to exercise. Figure 1 illustrates the experimental timeline for each set (prior/post LLLT application). Basal blood samples were collected from the animals prior to initiating animal experimentation. Following 24 h, the animals were gradually adapted to the act of climbing for three consecutive days; then a maximum load test was carried out. Following 24 h, the animals were submitted to a resistance exercise bout with or without LLLT application (detailed in Figure 1). At the end of the experiment, the animals were anesthetized for blood collection and were euthanized for the removal of the gastrocnemius muscle.



**Fig. 1.** Schematic timeline of the study design. LLLT, low-level laser therapy.

### *Familiarization and resistance training bout*

The familiarization and dynamic resistance exercise were modified of Sanches (2014). A ladder adapted for rats containing 54 vertical steps and a cage at the top, which it was covered with a cloth to promote a dark environment for the animal resting between the

climbs. A maximum load test was performed to determine target exercise load. Initial load test was 75% of the body weight, which it was attached to the base rat tail. The load was progressively increased by 15% of the body weight in subsequent climbs until the animal failed to complete the climb to the top of the ladder. A 2-min rest was given for each attempt, and the load of the last complete climb was established as a maximum load. The resistance exercise bout was then performed after 48 h rest by using individual maximum load for each rat. The rats performed four climbs with a 2-min time interval between climbs. An example for resistance exercise can be visualized from the open link <https://goo.gl/Vtyzpd>.

### ***LLLT protocol***

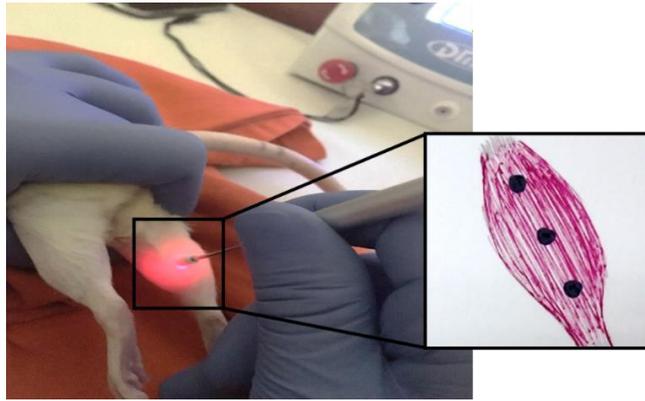
We used a DMC Thera Lase (São Carlos, SP, Brazil), and the data regarding the parameters used are summarized in Table 1. The laser was applied prior or post resistance exercise as assigned in the experimental follow-up (Figure 1).

**Table 1.** Laser irradiation parameters.

| Experimental groups | Wave length (nm) | Laser beam (cm <sup>2</sup> ) | Output power (mW) | Power density (W/cm <sup>2</sup> ) | Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> ) | Energy per point (J) | Irradiation time per point (s) |
|---------------------|------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------------------|---|----------------------|--------------------------------|
| <b>Ctr</b>          | ---              | ---                           | ---               | ---                                | ---                                       | ---                  | 40                             |
| <b>2J</b>           | 830              | 0.028                         | 100               | 3,57                               | 144                                       | 2                    | 20                             |
| <b>4J</b>           | 830              | 0.028                         | 100               | 3,57                               | 144                                       | 4                    | 40                             |
| <b>8J</b>           | 830              | 0.028                         | 100               | 3,57                               | 144                                       | 8                    | 80                             |
| <b>4J-PEA</b>       | 830              | 0.028                         | 100               | 3,57                               | 144                                       | 4                    | 40                             |

PEA, post-exercise application.

The irradiations were applied to three points of the forelegs in the posterior region of the gastrocnemius muscle (Figure 2) according to a modified protocol (Amadio *et al.*, 2015).



**Fig. 2.** Low-level laser therapy application in the three points of the gastrocnemius.

### ***Blood and muscle collection***

Blood samples (1.5 mL) were collected from orbital venous plexus after the animals were given one drop of anesthetic eye drops (5% Isoflurane, SP, Brazil), and blood was centrifuged at 4000 rpm for 12 min (4°C), with the serum stored at –80°C. At the end of the experiment, the animals were euthanized with a urethane overdose (4.8 g kg<sup>-1</sup> *i.p.*), and the gastrocnemius muscles of the right hind paw were quickly removed. The muscle was divided into two parts, with one piece intended for immunohistochemistry analysis, and the other piece frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C.

### ***Lactate, creatine kinase (CK) and lactic dehydrogenase (LDH) levels***

Quantification of the total blood lactate, as well as CK and LDH levels, were performed using Labtest kits (Biotécnica, MG, Brazil). The working reagents were used according to the amount of serum obtained during blood collection. We used a 96-pore plate, and lactate assay was carried out with 10 µL serum into 1 mL of buffer reagent. A total of 12 µL serum was added into 300 µL buffer reagent to CK analysis. LDH assay was carried out with 6 µL serum into 300 µL buffer reagent. Analyses were performed on a Spectra MaxM5 spectrophotometer (Molecular Devices, CA, USA).

### ***Gene expression***

One microgram of total RNA was extracted, purified and used for cDNA synthesis and Real-Time PCR gene expression analysis as detailed elsewhere (Manchini *et al.*, 2014). One microliter of reverse transcription reaction was obtained as previously described (Silva *et al.*, 2014) and used for real-Time PCR at Applied Biosystems 7500 Fast PCR (ABI Prism, Applied Biosystems, CA, USA) using the SYBRGreen. Experiments were performed in triplicates for each target gene: TNF- $\alpha$  (primers forward 5`-AAATGGGCTCCCTCTATCAGTTC-3`reverse5`-TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGA

C-3` (GenBank:X66539); interleukin 6 (IL-6: primers forward 5`-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3` reverse 5`-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGC C-3` (GenBank:E02522); IL-1 $\beta$  (primers forward 5`-CAGGAAGGCAGTGTCACTCA-3` reverse 5`-GGGATTTTGTTCGTTGCTTGT-3` (GenBank:M98820.1); cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1: primers forward 5`-ACACTCCAACAGAGCACCAT-3` reverse 5`-CTGACAGCGCAGCTCATTG-3 (GenBanK:NM\_030845.1); monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1: primers forward 5`-GCCTGTTGTTACAGTTGCT-3` reverse 5`-ATGAGTAGCAGCAGGTGAGTG-3` - (GenBanK:NM\_031530.1); IL-10 (primers forward 5`-TTGAACCACCCGGCATCTAC-3` reverse 5`-CCAAGGAGTTGCTCCC GTTA-3` (GenBank: NM\_012854.2). Target gene abundance was quantified as a relative value for internal control beta-actin ( $\beta$ -actin: forward primer 5`-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3` and reverse primer 5`-ACATCTGCTGGAAGG TGGAC-3`) (GenBank: NM\_031144.3). Quantitative values for the target gene and  $\beta$ -Actin mRNA transcription were obtained from the threshold cycle number, where the increase in the signal associated with an exponential growth of PCR products begins to be detected. Melting curves were generated at the end of every run to ensure product uniformity. The relative target gene expression level was normalized by  $\beta$ -actin expression as an endogenous RNA control.  $\Delta$ Ct values of the samples were determined by subtracting the average Ct value of target gene mRNA from the average Ct value of the internal control  $\beta$ -actin. The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  parameter was used to express the relative expression data.

### ***Immunohistochemistry***

Gastrocnemius muscles were embedded in paraffin and prepared for immunohistochemical assays as recently described by us (Marques *et al.*, 2016). Tissue slides were incubated with mouse anti-rat CD68 (1:50, Abcam, Tokyo, Japan) for 18 h and, after washing in PBS (three times, 5 min), sections were incubated with secondary antibody (1:1; Histofine, Tokyo, Japan) for 30 min. After washing in PBS (3 $\times$  5 min washes), a coloring reaction was carried out with diaminobenzidine (Scytek Laboratories, Logan, USA) and nuclei were counterstained with hematoxylin. Positive area staining for each of the tags was observed under a light microscope (Leica DM/LS, Leica Microsystems Ltda., Germany), and images were captured and analyzed by a microcomputer equipped with Leica Qwin plus V.3.2.0 software. From each sample, five

images were recorded of different view fields, including each stained area, using a  $\times 40$  magnification.

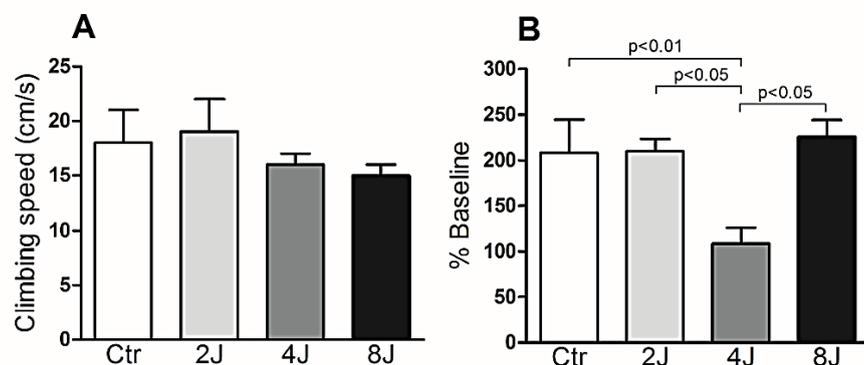
### ***Statistical analysis***

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error and were analyzed with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data normality was analyzed with Shapiro-Wilk test. Statistical analysis used One or Two-way ANOVA analysis of variance or Kruskal-Wallis test, followed by appropriate post hoc tests (Bonferroni for parametric data or Dunn's for non-parametric data). Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant

## **RESULTS**

### ***Exercise performance and fatigue marker***

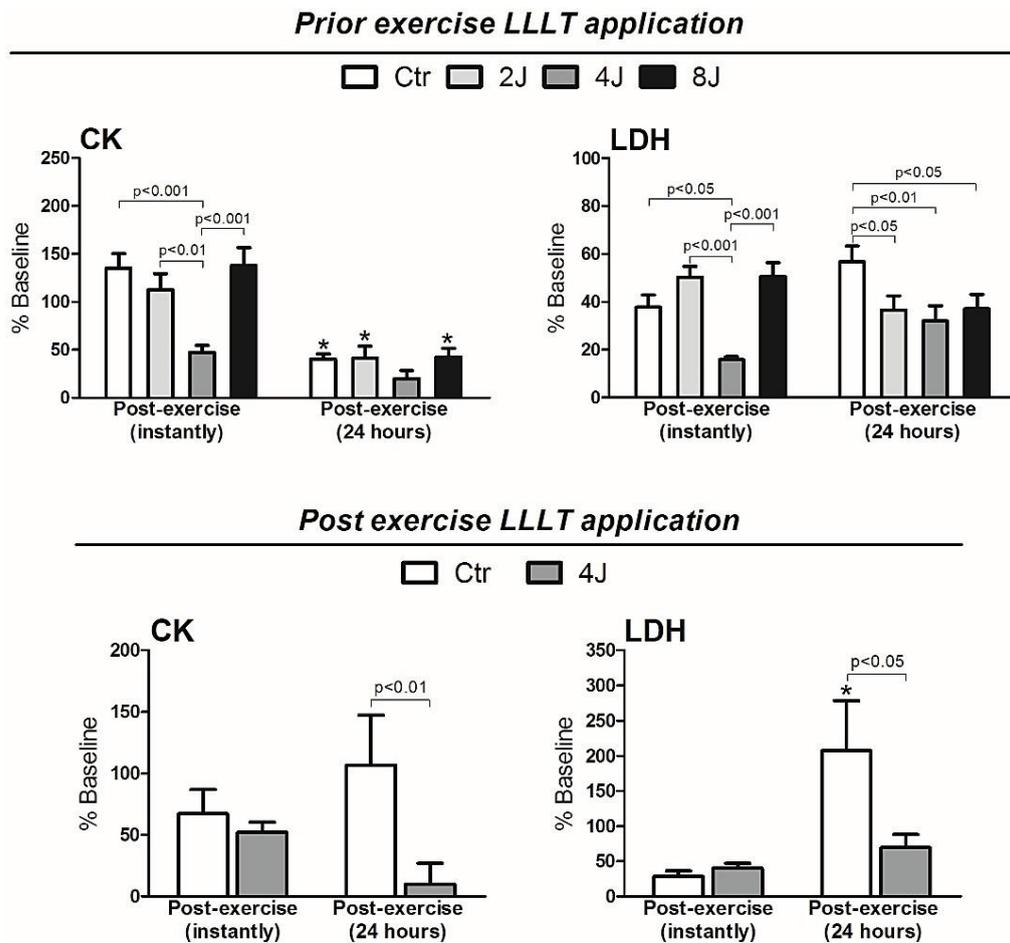
The load work during resistance exercise bout was similar between Ctr ( $225 \pm 10$  g), 2J ( $215 \pm 8$  g), 4J ( $209 \pm 9$  g) and 8J ( $226 \pm 9$  g) groups. Figure 3 shows the results for exercise performance and blood lactate concentration. In the comparison between experimental groups, we have not identified significant differences in the average speed during the four climbs (Figure 3A). The blood lactate level, a glycolytic muscle metabolism by-product, is a valuable indicator related to the development of muscle fatigue (Leal Junior, *et al.*, 2009a). As shown in the Figure 3B, all groups increased their lactate levels from the baseline to the instantly post-exercise assessments. There was, however, a dose-dependent effect of LLLT to attenuate lactate increases; thus, 4J significantly attenuated the lactate increases compared to the other groups.



**Fig. 3.** (A) exercise performance on climbs and (B) blood lactate concentration during resistance exercise in rats submitted to prior low-level laser therapy application. Significant differences between each group are displayed in each graph.

### Skeletal muscle injury makers

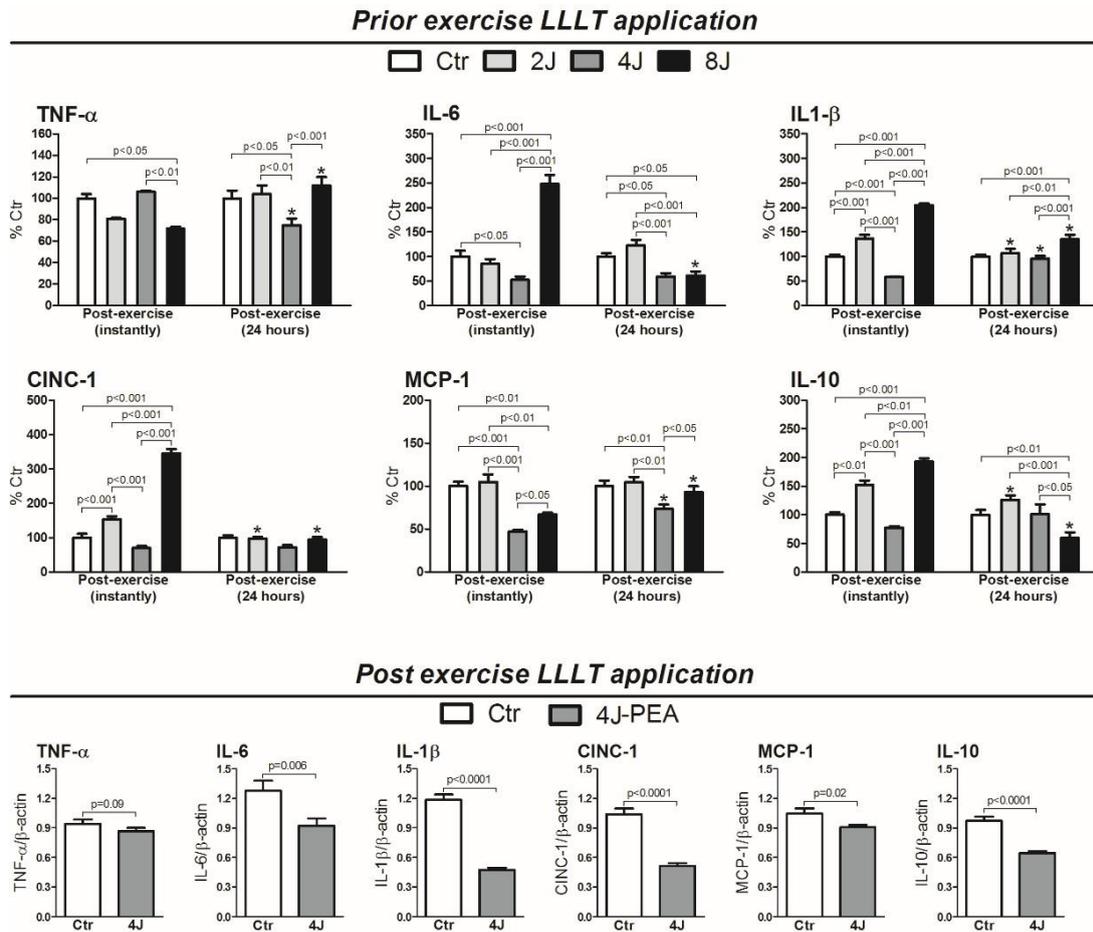
Experiments were performed to analyze LLLT repercussion on skeletal muscle injury when irradiations were applied prior resistance exercise (Figure 4). In this regard, CK and LDH instantly post-exercise levels were significantly lower only with 4J dose. The CK level was decreased and no significantly different between the four experimental groups at 24 h post-exercise. On the other hand, LDH levels were maintained high even after 24 h of rest, although all irradiation parameters resulted in lower LDH values than Ctr rats. Considering that prior exercise application of 4J was more efficient to reduce muscle injury, we performed experiments to determine whether similar effects could be noticed when 4J irradiation was applied instantly post-exercise (Figure 4). Again, we have reported an increase in CK e LDH level at instantly post-exercise relative to baseline, which has been significantly evident at 24 h post-exercise for Ctr group. The 4J irradiation was useful to reduce CK and LDH levels compared with Ctr group.



**Fig. 4.** Graphical display of the LLLT application prior (upper panel) and post (bottom panel) -resistance exercise to modulate the blood levels of creatine kinase (CK) and lactic dehydrogenase (LDH). Analyses were carried out in samples obtained from ten rats for each group at instantly and 24 h after resistance exercise. Significant differences between each group are displayed in each figure. \*indicates significant difference ( $p < 0.01$ ) compared to instantly time

### Skeletal muscle inflammation makers

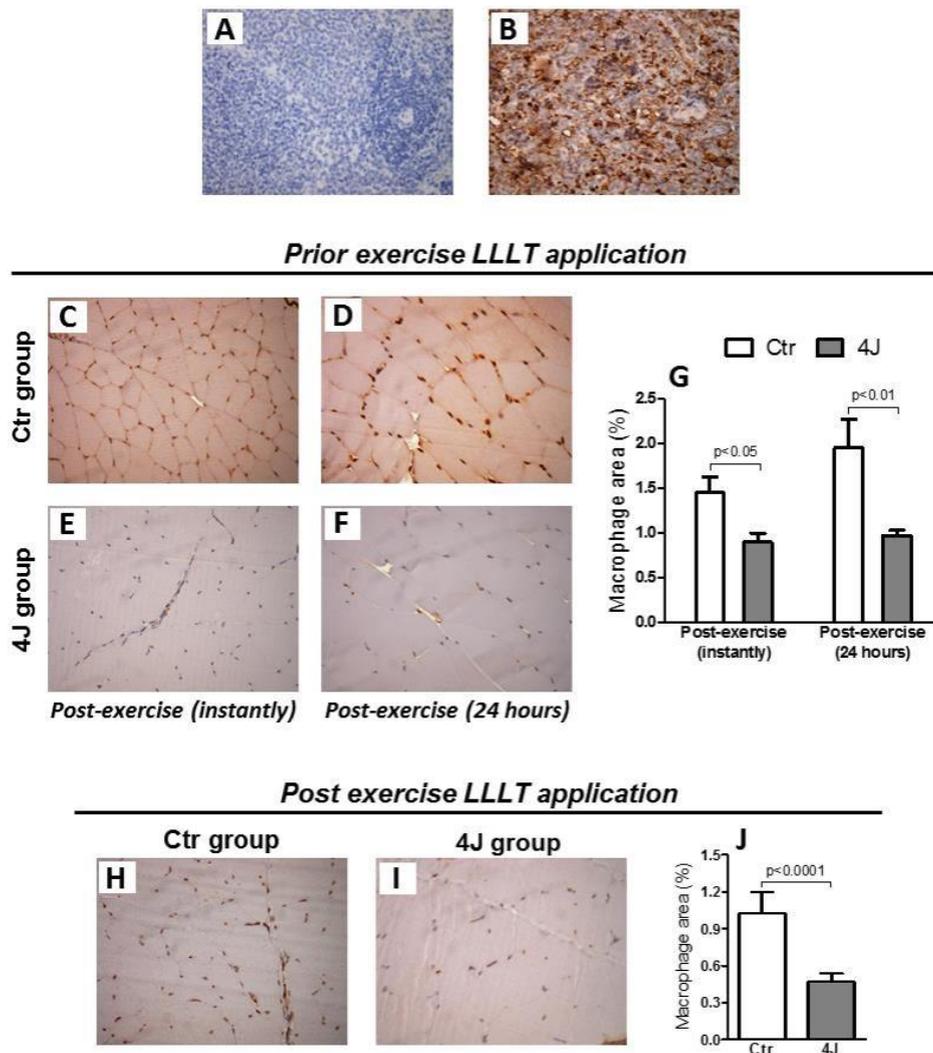
To determine the extent of inflammation post-exercise and identify inflammatory cytokines that were mediated by the LLLT, we performed an unbiased cytokine screen. Figure 5 shows comparisons of the mean values of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , CINC-1, MCP-1 and IL-10 across sampling time points. There was a dose-dependent effect of laser, and results that are more evident were reported for prior exercise application of 4J. Thus, IL-6, IL-1 $\beta$ , CINC-1 and MCP-1 content at instantly post-exercise was significantly lower in the 4J group compared with Ctr group. In respect to anti-inflammatory IL-10, this cytokine was up-regulated in the muscle of rats suffering 2J and 8J at instantly post-exercise. The prior exercise application of 4J was also associated with down-regulation of TNF- $\alpha$ , IL-6, and MCP-1 compared with Ctr group at 24 h post-exercise. The IL-10 levels were only changed downward in the 8J group compared with Ctr group. We have extended the 4J application at instantly post-exercise, and this is irradiation dose was associated with lower muscle levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , CINC-1, MCP-1 and IL-10 compared with Ctr group at 24 h post-exercise (Figure 5).



**Fig. 5.** Graphical display of the LLLT application prior (upper panel) and post (bottom panel) -resistance exercise to modulate the gastrocnemius muscle gene expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL- $\beta$ ), interleukin 10 (IL-10), cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Analyses were carried out in gastrocnemius muscle samples obtained from eight rats for each group sacrificed at instantly and 24 h after resistance exercise. Significant differences between each group are displayed in each figure. \*indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to instantly time.

### *Skeletal muscle macrophage infiltration*

As MCP-1 is an important mediator of macrophage infiltration into the injured skeletal muscle (Shireman *et al.*, 2007), we analyzed the muscle cross sections for CD68+ using immunohistochemistry (Figure 6). Given that a 4J dose has decreased tissue expression of MCP-1, we expected that macrophage infiltration would be reduced with a 4J application. As expected, positive areas for CD68 were significantly lower instantly and 24 h post-exercise in animals submitted to prior 4J irradiations. Additionally, we noted a similar course when 4J was applied post-exercise.



**Fig.6.** Effect of the LLLT application with 4J energy in the macrophage infiltration. Brown stain indicates positive immunoreactivity for macrophages. Spleen tissue was used as a negative control (A), in which the assay was performed with omission of the CD68. On the other hand, positive control were spleen cells incubated with CD68 (B). Analyses were carried out in gastrocnemius muscle samples obtained from four rats for each group. Positive immunoreactivity to CD68 was detected in the Ctr group instantly (C) and 24 h (D) after resistance exercise. Illustrations for rats submitted to 4J prior exercise are shown in panels E (instantly post-exercise) and F (24 h post-exercise), respectively. Panel G is representative of the statistical comparisons between Ctr and 4J groups at instantly and 24 h after resistance exercise. The bottom panels illustrate positive immunoreactivity to CD68 in Ctr group (H) and rats submitted to 4J (I) instantly post-exercise. Data are representative of analyses carried out at 24 h post-exercise. Panel J is representative of the statistical comparisons between Ctr and 4J groups. Significant differences between each group are displayed in each figure. Magnification 40 x (scale bar = 20  $\mu$ m).

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to determine a suitable standard dose of LLLT to reduce muscle fatigue and inflammation in an experimental model of resistance exercise. We evaluated three different doses to help establish a “therapeutic window” for prior LLLT application to resistance exercise. These findings were also reported for the application of LLLT instantly after effort, in which the good standard dose was considered beneficial for recovery enhancement.

We have irradiated skeletal muscle prior exercise because evidence has shown that the LLLT have ergogenic effects and protects against tissue injury (Leal-Junior *et al.*, 2015). In our study, 4J dose showed pivotal role in the improvement of blood lactate instantly post-resistance exercise, but LLLT has not been associated with improved muscle performance, as assessed by climbing speed. This data is consistent with other studies that have not reported a positive effect of pre-exercise light therapy to increase performance (Leal Junior, *et al.*, 2009a; Dos Reis *et al.*, 2014). In respect to lactate, its accumulation is a good indicator of increases in H<sup>+</sup> protons and decreases in blood and cellular pH. These factors promote metabolic acidosis, and consequently the muscle fatigue (Robergs *et al.*, 2004). Thus, our lactate data could be very helpful thinking about sports modalities that lead to a boost of blood lactate such as mountaineering, bodybuilding, and medium-distance running. Therefore, 4J dose would be the target dose to be applied in athletes. We have not identified studies that evaluated the role of LLLT in the lactate production post-resistance exercise in rats. A single study of Patrocínio *et al.* (2013) has shown that long-term intervention with LLLT 808 nm did not result in an alteration in the baseline lactate and instantly after the protocol to determine the maximal load on resistance training.

When it comes to precursors of muscle injury, changes in CK and LDH levels have been used as approaches for monitoring of the strenuous exercise (Brancaccio *et al.*, 2006).

Our results also illustrate an increased level of these enzymes induced by the resistance exercise, which validates our experimental model as a useful physiological approach for muscular stress. In respect to the primary goal, it was found a dose-dependent effect of LLLT, in which 4J significantly decreased CK and LDH levels compared to Ctr group or other irradiation parameters instantly post-exercise. For analyses carried out 24 h post-exercise, no laser doses resulted in CK values significantly different from the Ctr group. However, LDH level was set down in all LLLT groups. The best results of 4J have led to the test if its application post-exercise could also decrease muscle injury. In fact, CK and LDH levels were lower in irradiated rats compared with Ctr groups. It is important to highlight that analysis performed in this study do not allow us to explore mechanisms of LLLT action. The CK and LDH reductions could be linked to the ability of LLLT to inhibit tissue ischemia by reducing the reactive oxygen species and creatine phosphokinase activity, while antioxidants proteins increase (Leal Junior, *et al.*, 2009a). Moreover, data are showing that a single irradiation with LLLT can increase the cytochrome c-oxidase activity (Hayworth *et al.*, 2010). It means that LLLT leads to higher mitochondrial activity through increasing mitochondrial respiratory chain, which therefore increases ATP availability into skeletal muscle. Also, we have identified here that expression of the chemokine CINC-1, which promotes phagocyte infiltration, was increased by exercise and was reduced again by the 4J irradiation. The CINC-1 expression is mostly regulated by redox-sensitive transcription factors (Aoi *et al.*, 2007). Therefore, the decrease of CINC-1 would suggest less muscle oxidization due to the elevation of antioxidant activity. This finding indicates that 4J can attenuate muscle damage after resistance exercise by diminishing the redox-sensitive inflammatory cascade by reactive oxygen species scavenging. We believe that these aspects should be investigated in further studies in this field.

Data presented here also support the hypothesis of an attenuated inflammatory response to LLLT following exercise bout (Aver Vanin *et al.*, 2016). The novelty of this study is the skeletal muscle reduction for several pro-inflammatory cytokines instantly and late (24 h) post-resistance exercise. Notwithstanding, optimal laser dose (*i.e.* 4J) has been clarified and showed to be effective independent whether LLLT was applied prior or post-exercise bout. Interestingly, it was found that 4J was associated with reduced IL-10 level in the muscle. It is possible that a minor pro-inflammatory marker release with 4J has resulted in a reduced extent of inflammation. Hence, at the time point of our analyses, a

higher IL-10 expression would not be required to counteract the increase of the pro-inflammatory cytokines.

The increases in cytokines also mirrored the changes in macrophage, providing suggestive evidence for a chemotactic relationship between these cytokines and inflammatory cell populations post-resistance exercise. In fact, we have found a greater expression of MCP-1 following resistance exercise, in which it has been widely reported following muscle damage appears (Warren *et al.*, 2004; Shireman *et al.*, 2007). In our case, prior or post-exercise 4J irradiation has resulted in a significant attenuation of MCP-1 in line with reduced macrophage infiltrate. Overall, these findings may be a consequence of an accelerated muscle recovery post-exercise.

In conclusion, data presented here support the hypothesis that the application of phototherapy prior or post resistance exercise can lead to improving skeletal muscle damage and inflammation. Moreover, injury and the inflammatory environment in the muscle seemed to be optimized when 4J dose is applied.

### **Perspectives**

This study suggests that prior or post-resistance exercise LLLT application attenuated skeletal muscle damage and inflammation, resulting in improvement of muscle recovery. Moreover, we attempted to clarify an ideal LLLT dose for best results, in which we found that 4J showed a greater protective influence. Therefore, it is expected that athletes or practitioners of resistance exercise may have an attenuation of muscle injury or accelerated recovery when submitted a single 4J application.

### **Acknowledgements**

This study was supported by São Paulo Research Foundation - FAPESP (Grant No. 15/11028-9).

### **REFERENCES**

Amadio EM, Serra AJ, Guaraldo SA, Silva Jr JA, Antonio EL, Silva F, Portes LA, Tucci PJ, Leal-Junior EC, de Carvalho PTC. The action of pre-exercise low-level therapy (LLLT) on the expression of IL-6 and TNF $\alpha$  proteins and on the functional fitness of elderly rats subjected to aerobic training. *Lasers Med Sci* 2015; 30: 1127-1134.

Aoi W, Naito Y, Nakamura T, Akagiri S, Masuyama A, Takano T, Mizushima K, Yoshikawa T. Inhibitory effect of fermented milk on delayed-onset muscle damage after

exercise. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 140-145.

Assis L, Milares LP, Almeida T, Tim C, Magri A, Fernandes KR, Medalha C, Renno AC. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis Cartilage* 2016; 24: 169-177.

Aver Vanin A, De Marchi T, Silva Tomazoni S, Tairova O, Leão Casalechi H, de Carvalho PTC, Bjordal JM, Leal-Junior EC. Pre-exercise infrared low-level laser therapy (810 nm) in skeletal muscle performance and postexercise recovery in humans, what is the optimal dose? A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Photomed Laser Surg* 2016; 34: 473-482

Brancaccio P, Limongelli FM, Maffulli N. Monitoring of serum enzymes in sport. *Br J Sports Med* 2006; 40 :96-97.

Bocalini DS, Portes LA, Ribeiro KJ, Tonicelo R, Rica RL, Pontes FL, Silva Jr JA, Serra AJ. Insight for learning and stability of one repetition maximum test in subjects with or without experience on resistance training. *Gazzetta Medica Italiana* 2013; 172: 845-851

Dos Reis FA, da Silva BA, Laraia EM, de Melo RM, Silva PH, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. Effects of pre- or post-exercise low-level laser therapy (830 nm) on skeletal muscle fatigue and biochemical markers of recovery in humans: double-blind placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg* 2014; 32 :106-112.

Guaraldo SA, Serra AJ, Amadio EM, Antônio EL, Silva F, Portes LA, Tucci PJ, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. 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* 2016; 31: 833-840.

Hayworth CR, Rojas JC, Padilla E, Holmes GM, Sheridan EC, Gonzalez-Lima F. In vivo low-level light therapy increases cytochrome oxidase in skeletal muscle. *Photochem Photobiol* 2010; 86: 673-680.

Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, dos Reis FA, Albertini R, de Almeida P, Leal Junior EC, de Carvalho PTC. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochem Photobiol* 2012; 88: 1546-1550.

Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Baroni BM, De Marchi T, Rossi RP, Grosselli D, Generosi RA, de Godoi V, Basso M, Mancalossi JL, Bjordal JM. Comparison between single-diode low-level laser therapy (LLLT) and LED multi-diode (cluster) therapy (LEDT) applications before high-intensity exercise. *Photomed Laser Surg* 2009a; 27:

617-623.

Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Dalan F, Ferrari M, Sbabo FM, Generosi RA, Baroni BM, Penna SC, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of 655-nm low-level laser therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Photomed Laser Surg* 2008; 26: 419-424.

Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Frigo L, De Marchi T, Rossi RP, de Godoi V, Tomazoni SS, Silva DP, Basso M, Filho PL, de Valls Corsetti F, Iversen VV, Bjordal JM. Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise-induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. *J Orthop Sports* 2010; 40: 524-532.

Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Rossi RP, De Marchi T, Baroni BM, de Godoi V, Marcos RL, Ramos L, Bjordal JM. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 572-577.

Leal-Junior EC, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho Pde T, Dal Corso S, Bjordal JM. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2015; 30: 925-939

Lima FD, Stamm DN, Della-Pace ID, Dobrachinski F, de Carvalho NR, Royes LF, Soares FA, Rocha JB, González-Gallego J, Bresciani G. Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. *PLoS One* 2013; 8: e55668.

Manchini MT, Serra AJ, Feliciano Rdos S, Santana ET, Antônio EL, de Carvalho PTC, Montemor J, Crajoinas RO, Girardi AC, Tucci PJ, Silva JA Jr. Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *PLoS One* 2014; 9: e101270.

Marques AC, Albertini R, Serra AJ, da Silva EA, de Oliveira VL, Silva LM, Leal-Junior EC, de Carvalho PT. Photobiomodulation therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats. *Lasers Med Sci* 2016; 31: 1915-1923.

Patrocinio T, Sardim AC, Assis L, Fernandes KR, Rodrigues N, Renno AC. Effect of low-level laser therapy (808 nm) in skeletal muscle after resistance exercise training in rats. *Photomed Laser Surg* 2013; 31: 492-498.

Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic

acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R502-516.

Sanches IC, Conti FF, Sartori M, Irigoyen MC, De Angelis K. Standardization of resistance exercise training: effects in diabetic ovariectomized rats. *Int J Sports Med* 2014; 35: 323-329.

Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 775-785.

Silva AA, Leal-Junior EC, D'Avila Kde A, Serra AJ, Albertini R, França CM, Nishida JA, de Carvalho Pde T. 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* 2015; 30: 1719-1727.

Silva JA Jr, Santana ET, Manchini MT, Antônio EL, Bocalini DS, Krieger JE, Tucci PJ, Serra AJ. Exercise training can prevent cardiac hypertrophy induced by sympathetic hyperactivity with modulation of kallikrein-kinin pathway and angiogenesis. *PLoS One* 2014; 10: e91017.

Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med* 2008; 38: 947-969.

Sussai DA, Carvalho Pde T, Dourado DM, Belchior AC, dos Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci* 2010; 25: 115-120.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R345-353.

Warren GL, O'Farrell L, Summan M, Hulderman T, Mishra D, Luster MI, Kuziel WA, Simeonova PP. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1031-1036.

## 5. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido na literatura que o dano muscular esquelético induzido pelo exercício de alta intensidade resulta na liberação de proteínas citoplasmáticas, quimiocinas e citocinas inflamatórias para o meio extracelular. A aplicação de LBI surge como alternativa promissora para abrandar os danos causados pelo estresse mecânico, melhorar o perfil inflamatório e, conseqüentemente, acelerar a recuperação muscular esquelética. Tais situações vigoram como determinantes para obtenção de resultados mais efetivos e prevenção de lesões musculares severas. Embora diversos estudos investiguem o papel do LBI em reduzir marcadores de lesão e inflamação, os parâmetros de irradiação tal como a quantidade total de energia, tempo de irradiação, ainda não estão definitivamente estabelecidos. Outro ponto que desperta interesse na literatura consiste em determinar qual o momento mais apropriado de aplicação do LBI, antes ou após o exercício.

A proposta deste estudo é alicerçada nas observações postuladas acima, em que avaliamos o efeito do LBI aplicado antes e após uma sessão de exercício resistido de carga máxima em marcadores bioquímicos de lesão e inflamação muscular em ratas saudáveis. Na aplicação prévia ao exercício resistido, avaliamos três diferentes parâmetros de irradiação afim de estabelecer um dose padrão-ouro. Destes experimentos foi possível determinar qual a dosagem de LBI resultou em melhores benefícios e, que foi utilizada para aplicação imediatamente após exercício resistido.

O objetivo de irradiar o músculo esquelético antes do exercício derivou de diversos estudos que evidenciaram que o LBI possui efeitos ergogênicos importantes, atuando na proteção das lesões teciduais.<sup>16</sup> Em nosso estudo, a dose de 4J exibiu os resultados mais significativos na melhora do nível sérico de lactato dosado imediatamente após o exercício resistido. Todavia, o emprego do LBI, independente da dose utilizada (2, 4 ou 8 J) não resultou em melhora do desempenho físico, como representado pela velocidade da escalada em quatro subidas. Estes dados corroboram informações de estudos anteriores, em que não houve documentação de efeito positivo da laserterapia pré-exercício no desempenho<sup>8,33</sup>. Nesses estudos, os autores observaram que o LBI aplicado previamente ao esforço não foi hábil a induzir aumento da força muscular e da quantidade de repetições máximas em humanos. No que diz respeito ao lactato,

o acúmulo desse metabólito constitui um indicador bom de aumento nos íons de hidrogênio ( $H^+$ ) e diminuição no pH sanguíneo, o que resulta em acidose metabólica e, conseqüentemente, desenvolvimento de fadiga muscular.<sup>34</sup>

Nós não identificamos estudos prévios que avaliaram a repercussão do LBI no teor de lactato sanguíneo em ratos submetidos a exercício resistido. Um único estudo de Patrocínio et al.<sup>6</sup>, no qual os autores avaliaram os níveis de lactato no início e final do protocolo de cinco semanas de treinamento, mostrou que a intervenção de longo prazo com LBI 808 nm não resultou em alteração no lactato basal e imediatamente após o protocolo para determinar a carga máxima no treinamento de resistido. Assim, nossos dados de lactato em ratas podem ser translacionados para humanos enveredados em modalidades esportivas que induzem aumento substancial do lactato sanguíneo, como montanhismo, “musculação” e corrida de média distância. Neste cenário, a aplicação de 4J poderia ser considerada como dose alvo para ser aplicada em atletas antes do exercício ou competição para que, no mínimo, postergue a acidose metabólica.

Considerando marcadores de lesão muscular, o monitoramento do nível sérico de CK e LDH é corriqueiro para determinar a repercussão muscular de exercícios extenuantes.<sup>35</sup> De Marchi et. al.<sup>26</sup> constataram redução significativa na atividade da CK e LDH com aplicação de LBI antes de teste de corrida de carga progressiva em homens destreinados. Baroni et al.<sup>25</sup> também mostraram que o LBI foi eficaz em reduzir os níveis de CK e LDH após teste de contração excêntricas do joelho em humanos. Leal Junior et al.<sup>36</sup> observou resultados positivos do LBI aplicado previamente a contrações musculares induzidas por eletroestimulação. Os autores observaram que diferentes doses de irradiação (0.1 J, 0.3 J, 1 J) reduziram os níveis séricos da CK em ratos. Esses achados corroboram com nossos resultados que também ilustram aumento no nível dessas enzimas com o exercício resistido, validando nosso modelo experimental como uma abordagem fisiológica útil para induzir estresse muscular. Em relação ao objetivo principal, verificou-se efeito dependente da dose de LBI, em que 4J de energia resultou em abrandamento significativo dos níveis séricos de CK e LDH imediatamente após o exercício. Para as análises realizadas 24 horas após o exercício, todas as doses de laser testadas não resultaram em valores de CK significativamente diferentes do grupo Ctr. Contudo, o nível de LDH foi menor em todos os grupos LBI em relação ao controle. Os resultados favoráveis para a

dose de 4J conduziu a caracterizar se sua aplicação após o exercício também poderia resultar em abrandamento dos níveis de marcadores de lesão muscular. De fato, os níveis de CK e LDH foram significativamente menores nas ratas irradiadas em comparação com o grupo controle. É importante destacar que a análise realizada neste estudo não nos permite identificar os mecanismos de ação do LBI responsáveis por atenuar a lesão muscular induzida pelo exercício resistido. As reduções de CK e LDH podem estar ligadas ao potencial do LBI em inibir a isquemia tecidual, em reduzir o “*burst*” de espécies reativas de oxigênio (ROS) e atividade da creatino fosfoquinase e, em aumentar a concentração de proteínas antioxidantes.<sup>33</sup> Além disso, existem dados que ilustram que uma única irradiação com LBI é capaz de aumentar a atividade da citocromo c-oxidase, indicando que o LBI promove maior atividade mitocondrial, levando ao aumento de ATP.<sup>37</sup> Deve-se mencionar nossas análises de expressão da quimiocina CINC-1, que modula a infiltração de fagócitos nos tecidos. Nós observamos que a dose de 4J promoveu níveis menores de CINC-1 em comparação ao grupo controle. A expressão de CINC-1 é regulada principalmente por fatores de transcrição sensíveis redox.<sup>38</sup> Assim, o teor menor de CINC-1 ligado ao LBI sugere menor estresse oxidativo muscular. Este achado indica que 4J pode atenuar os danos musculares após o exercício resistido, diminuindo a cascata inflamatória redox-sensível.

Nossos dados também são singulares a achados prévios da ação anti-inflamatória do LBI. Aver vanin et al.<sup>39</sup> encontraram menor concentração sérica da IL-6 após exercício extenuante em atletas de alto nível. Em estudo prévio de nosso grupo, nós observamos redução na concentração das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  em ratos idosos submetidos a exercício de natação por 6 semanas concomitante com aplicação de LBI.<sup>18</sup>

É conhecido que a ação de células inflamatórias no tecido muscular pode perdurar por vários dias após exercício de alta intensidade como resultado da produção de ROS e enzimas citotóxicas.<sup>13,40</sup> Esse cenário pode contribuir para a maior liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatória no local da lesão. A grande maioria dos estudos que investigaram o efeito do LBI sobre marcadores inflamatórios após exercício resistido analisaram de duas a quatro citocinas em intervenções a longo prazo.<sup>17,18</sup>

Nós não encontramos, até o presente momento, nenhum estudo mostrando o efeito local LBI sobre uma gama de citocinas em diferentes tempos após exercício resistido em ratos. Essa informação consolida certo ineditismo para nosso estudo. Em nossos casos, houve menor teor muscular de diversas citocinas pró-inflamatórias imediatamente e tardiamente (24 horas) pós-exercício resistido. Destaque-se a utilização de irradiações com 4J de energia, que mostrou abrandar a elevação de citocinas pró-inflamatórias independentemente se a LBI for aplicada antes ou depois da sessão de exercício. Curiosamente, nós verificamos que a aplicação de 4J antes ou após o exercício foi associada com níveis reduzidos de IL-10 no tecido muscular. A interpretação destes achados não simples, mas é possível que a menor expressão de citocinas pró-inflamatórias com 4J tenha resultado em extensão menor da inflamação, o que requereria menor produção da IL-10 para contrapor os efeitos inflamatórios. Além disso, no momento de nossas análises, as alterações na expressão da IL-10 poderiam ser independentes de aumento ou redução das citocinas pró-inflamatórias.

Os aumentos das citocinas inflamatórias também foram associados com mudanças na infiltração muscular de macrófagos, o que sugere uma relação quimiotóxica positiva entre citocinas e populações de células inflamatórias pós-exercício resistido. Assim, verificou-se maior expressão de MCP-1 após o exercício resistido, uma circunstância que é amplamente descrita após dano muscular.<sup>41,42</sup> Em nosso estudo, a irradiação com 4J antes ou após a sessão de exercício resistido resultou em atenuação significativa da MCP-1 e consequente redução na expressão muscular de macrófagos. É importante mencionar que não podemos excluir a hipótese da menor expressão de macrófagos no músculo seja resultar da aceleração da regeneração celular e não diretamente derivar da modulação quimiotóxica do LBI.

## **6. CONCLUSÃO**

Os dados deste estudo indicam que a aplicação do LBI antes ou após exercício resistido atenua a lesão e inflamação muscular esquelética, resultando em melhoria da recuperação muscular esquelética. Além disso, o parâmetro de irradiação para obter os melhores resultados também foi elucidado, destacando a irradiação com 4J como dose de maior influência protetora contra danos e inflamação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mooren & Volker. *Fisiologia do Exercício Molecular e Celular*. São Paulo: Santos; 2012.
2. Baumert P, Lake MJ, Stewart CE, Drust B, Erskine RM. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. *Eur J Appl Physiol*. 2016 Sep; 116 (9):1595–625.
3. Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev*. 2005; 11:64-85.
4. Foschini D, Prestes J, Charro MA. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. *Rev Bras de Cineantropom & Desempenho Hum*. 2007 Nov; 9 (1):101-6.
5. Ferraresi C, Hamblin M R, Parizotto N A. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med*. 2012 Nov; 1(4): 267–286.
6. Patrocínio T, Sardim AC, Assis L, Fernandes KR, Rodrigues N, Renno ACM. Effect of low-level laser therapy (808 nm) in skeletal muscle after resistance exercise training in rats. *Photomed Laser Surg*. 2013 Oct; 31(10):492-8.
7. Silva E. Microlesões celulares induzidas pelo exercício físico e respostas adaptativas no músculo esquelético. *Rev Digital- Buenos Aires*. 2009 Ago.
8. Dos Reis FA, Silva BA, Laraia EM, Melo RM, Silva PH, Leal-Junior ECP, et al. Effects of pre- or post-exercise low-level laser therapy (830 nm) on skeletal muscle fatigue and biochemical markers of recovery in humans: double-blind placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg*. 2014 Feb; 32(2):106-12.
9. Sussai DA, Carvalho PTC, Dourado DM, Belchior ACG, Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci*. 2010 Jan; 25(1):115-20.
10. Lapointe BM, Frenette J, Côté CH. Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. *J of Applied Physiol*. 2002 Mai, 92(5):1995-2004.
11. Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Fisioterapia em movimento*. 2005 Abr/Jun; 18(2):63-71.
12. Silva FOC, Macedo DV. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*. 2011 Fev; 13(4):320-28.
13. Fatouros IG, Jamurtas AZ. Insights into the molecular etiology of exercise-induced inflammation: opportunities for optimizing. *J Inflamm Res*. 2016 Oct, 21(9):175-86.

14. Pereira RF, Valenssio RT, Magosso, RF. Influências do exercício físico sobre os marcadores inflamatórios. *Rev.da educação física/UEM*. 2010; 21(4):721-29.
15. Watanabe K, Koizumi F, Kurashige Y, Tsurufuji S, Nakagawa H. Rat CINC, a Member of the Interleukin-8 Family, Is a Neutrophil-Specific Chemoattractant in Vivo. *Experimental and molecular pathology*.1991 Aug; 55(1):30-7.
16. Leal-Junior ECP, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho PTC, Dal Corso S, Bjordal JM. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2015 Feb; 30(2):925-39.
17. Leal-Júnior ECP, Almeida P, Tomazoni SS, de Carvalho PTC, Lopes-Martins RAB, Frigo L, et.al. Superpulsed low-level laser therapy protects skeletal muscle of mdx mice against damage, inflammation and morphological changes delaying dystrophy progression. *Plos one*. 2014 Mar; 9(3): e89453.
18. Amadio EM, Serra AJ, Guaraldo SA, Silva JAJr, Antonio L, Silva F, et.al. The action of pre-exercise low-level therapy (LLLTT) on the expression of IL-6 and TNFa proteins an on the functional fitness of elderly rats subjected to aerobic training. *Lasers Med Sci*. 2015 Apr; 30(3):1127-34.
19. Albuquerque-Pontes GM, Vieira RP, Tomazoni SS, Caires CO, Nemeth V, Vanin AA, et. al. Effect of pre-irradiation with different doses, wavelengths, and application intervals of low-level laser therapy on cytochrome c oxidase activity in intact skeletal muscle of rats. *Lasers Med Sci*. 2015 Jan; 30(1):59-66.
20. Antonialli FC. Fototerapia na performance e recuperação muscular pós-exercício: efeito da combinação de diferentes fontes de luz. Tese de Mestrado- Uninove.2014.
21. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Vanin AA, Baroni BM, Grosselli D, De Marchi T, et. al. Effect of 830nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci*. 2009a May; 24(3):425-31.
22. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Frigo L, De Marchi T, Rossi RP, Godoi V, et. al. Effects of low-level laser therapy (LLLTT) in the development of exercise-induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. *J. of Orthop. & S Phy Ther*. 2010x Aug; 40(8):524-32.
23. Higashi RH, Toma RL, Tucci HT, Pedroni CR, Ferreira PD, Baldini GS, et. al. Effects of low-level laser therapy on biceps braquialis muscle fatigue in young women. *Photomed Laser Surg*. 2013 Dec; 31(12): 586-94.
24. Toma RL, Tucci HT, Antunes HKM, Pedroni CR, Oliveira AS, Buck I, et. al. Effect of 808 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in elderly women. *Lasers Med Sci*. 2013 Sep; 28(5):1375-82.

25. Baroni BM, Leal Junior ECP, De Marchi T, Lopes AL, Salvador M, Vaz MA. Low-level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Nov; 110(4):789-96.
26. De Marchi T, Leal Junior ECP, Bortoli C, Tomazoli SS, Lopes-Martins RAB, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci*. 2012 Jan; 27(1):231-6.
27. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Baroni BM, De Marchi T, Taufer D, Manfro DS, et. al. Effect of 830nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci*. 2009b Nov; 24(6):857-6.
28. Bocalini DS, Portes LA, Ribeiro KJ, Tonicelo R, Rica RL, Pontes FL, et.al. Insight for learning and stability of one repetition maximum test in subjects with or without experience on resistance training. *Gazzetta Medica Italiana*. 2013; 172:845-51.
29. Silva AA, Leal-Junior EC, D'Avila K de A, Serra AJ, Albertini R, França CM, 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 Med Sci*. 2015 Aug; 30(6):1719-27.
30. Guaraldo SA, Serra AJ, Amadio EM, Antônio EL, Silva F, Portes LA, 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 Med Sci*. 2016 Jul; 31(5):833-40.
31. Sanches IC, Conti FF, Sartori M, Irigoyen MC, De Angelis K. Standardization of resistance exercise training: Effects in diabetic ovariectomized rats. *J Sports Med*. 2014 Apr; 35(4):323-29.
32. Serra AJ, Santos MH, Bocalini DS, Antônio EL, Levy RF, Santos AA, et. al. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *J Physiol*. 2010 Jul; 588(13):2431-42.
33. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Baroni BM, De Marchi T, Rossi RP, Grosselli D, et. al. Comparison between single-diode low-level laser therapy (LLLT) and LED multi-diode (cluster) therapy (LEDT) applications before high-intensity exercise. *Photomed Laser Surg*. 2009c Aug; 27(4):617-23.
34. Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol*. 2004 Sep;287(3): R502-16.
35. Brancaccio P, Limongelli FM, Maffulli N. Monitoring of serum enzymes in sport. *J Sports Med*. 2006 Feb;40(2):96-7.

36. Leal Júnior CE, Lopes-Martins RA, de Almeida P, Ramos L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2010y Apr; 108 (6): 1083-88.
37. Hayworth CR, Rojas JC, Padilla E, Holmes GM, Sheridan EC, Gonzalez-Lima F. In vivo low-level light therapy increases cytochrome oxidase in skeletal muscle. *Photochem Photobiol*. 2010 May-Jun;86(3):673-80.
38. Aoi W, Naito Y, Nakamura T, Akagiri S, Masuyama A, Takano T, et. al. Inhibitory effect of fermented milk on delayed-onset muscle damage after exercise. *J Nutr Biochem*. 2007 Feb;18(2):140-45.
39. Aver Vanin A, De Marchi T, Silva Tomazoni S, Tairova O, Leão Casalechi H, de Carvalho PTC, et, al. Pre-Exercise Infrared Low-Level Laser Therapy (810 nm) in Skeletal Muscle Performance and Postexercise Recovery in Humans, What Is the Optimal Dose? A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Photomed Laser Surg*. 2016 Oct;34(10):473-82.
40. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Feb; 288(2): R345-53.
41. Warren GL, O'Farrell L, Summan M, Hulderman T, Mishra D, Luster MI, et. al. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 May; 286(5):C1031-36.
42. Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar; 81(3):775-85.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Termo de ciência do Comitê de ética para uso de animais (Uninove).



#### Comitê de Ética para o Uso de Animais

São Paulo, 14 de Dezembro de 2016.

Assunto: Parecer sobre a ciência de projeto

“REPERCUSSÃO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO MUSCULAR ESQUELÉTICO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO DESEMPENHO FÍSICO E MARCADORES BIOQUÍMICOS DE RECUPERAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A TESTE ANAERÓBIO DE CARGA MÁXIMA”

Requerente: Prof. Dr. Andrey Jorge Serra

Modalidade de solicitação: Requerimento de ciência ao projeto aprovado por outra CEUA

Documentação Recebida:

- Projeto de pesquisa
- Carta de requerimento ao CEUA UNINOVE
- Carta de aprovação da CEUA UNIFESP

Parecer:

O Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA UNINOVE), em 14/12/16 TOMOU CIÊNCIA do Protocolo de Pesquisa UNIFESP nº 8868250615 intitulado: "REPERCUSSÃO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO MUSCULAR ESQUELÉTICO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO DESEMPENHO FÍSICO E MARCADORES BIOQUÍMICOS DE RECUPERAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A TESTE ANAERÓBIO DE CARGA MÁXIMA", apresentado pelo Professor Andrey Jorge Serra da Universidade Nove de Julho, que conta com prévia aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo.

Prof. Dra. Kátia De Angelis  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho

## 8.2. Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no uso de animais da UNIFESP/HSP.



# COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 17 de setembro de 2016  
CEUA N 8868250615

mo(a). Sr(a).  
pesquisador(a): Helenita Antonia De Oliveira  
Departamento/Disciplina: Cardiologia/medicina  
Orientador: Andrej Jorge Serra (orientador)

Título do projeto: "REPERCUSSÃO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO MUSCULAR ESQUELÉTICO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO DESEMPENHO FÍSICO E MARCADORES BIOQUÍMICOS DE RECUPERAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A TESTE ANAERÓBIO DE CARGA MÁXIMA".

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

O aumento da performance é uma constante na literatura relacionada ao exercício físico, e diversas ferramentas são atualmente empregadas na tentativa de reduzir a fadiga muscular e os danos teciduais ocasionados por atividades repetidas ou de alta intensidade. Dentre estas, destaca-se o uso da laserterapia. O uso do laser de baixa intensidade (LBI) é uma modalidade terapêutica largamente utilizada no processo de reparo tecidual de regiões lesadas, ao passo que estimula melhores respostas ao processo inflamatório, consequentemente reduzindo a dor. Apesar do fato de estudos conduzidos em humanos mostrarem os efeitos do laser no desempenho muscular e na produção de marcadores bioquímicos de fadiga, pouco se sabe sobre a ação desta terapia em modelos experimentais, especialmente quando realizada previamente ao exercício anaeróbico. Soma-se a isso o fato de não haver padronização dos parâmetros ótimos e laser nestas condições. Sendo assim, o objetivo deste estudo será analisar os efeitos da aplicação prévia de LBI no desempenho muscular e na produção de marcadores bioquímicos de fadiga e lesão em ratos submetidos a teste anaeróbico de carga máxima. Para tanto, serão utilizadas ratas Wistar, irradiadas no músculo gastrocnêmio com três diferentes doses de laser: 2J, 4J ou 8J.

**ANIMAIS:**  
Animais utilizados:  
32 ratos heterogênicos Wistar, Fêmeas, idade: 10 semanas  
Procedência: Biotério CEDEME  
Manutenção: Biotério da Disciplina de Fisiologia Cardiovascular

**IGÊNCIA DO ESTUDO:**  
Início previsto para: 08/2015, término previsto para: 12/2016

- Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 2/09/2015, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.
- Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
- Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
- Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
- Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



COMISSÃO DE ÉTICA EM INSPECÇÃO



Atenciosamente

Profa. Dra. Maria Lúcia de Azevedo  
Coordenadora da Comissão de Ética em Inspecção  
Unidade de Ensino de Física da USP

### 8.3. Carta de submissão do artigo na revista.

 Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports

[Home](#)

[Author](#)

[Review](#)

---

## Submission Confirmation Print

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**  
Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports

**Manuscript ID**  
SJMSS-O-923-16

**Title**  
Low-level laser therapy prior or post exercise reduces muscle damage and inflammation when used at a gold standard dose

**Authors**  
Oliveira, Helenita  
Antonio, Ednei  
Silva, Flávio  
Camillo de Carvalho, Paulo  
Feliciano, Regiane  
Yoshizaki, Amanda  
Vieira, Stella  
Mello, Brunno  
Labat, Rodrigo  
Leal Junior, Ernesto  
Bocalini, Danilo  
Silva Junior, José  
Tucci, Paulo  
Serra, Andrey

**Date Submitted**  
02-Dec-2016

---

---

[Author Dashboard](#)