



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

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO EFEITO DA TERAPIA POR  
FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA AO USO DE L-ARGININA  
SOBRE A FADIGA MUSCULAR, EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE TREINAMENTO AERÓBICO.**

**PAMELLA GABRIELA DOS SANTOS FERREIRA**

São Paulo, SP  
2020



**PAMELLA GABRIELA DOS SANTOS FERREIRA**

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO EFEITO DA TERAPIA POR  
FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA AO USO DE L-ARGININA  
SOBRE A FADIGA MUSCULAR, EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE TREINAMENTO AERÓBICO.**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho

Coorientador: Rodrigo Labat Marcos

São Paulo, SP

2020

Ferreira, Pamella Gabriela dos Santos.

Estudo pré-clínico do efeito da terapia por fotobiomodulação associada ao uso de L-Arginina sobre a fadiga muscular, em modelo experimental de treinamento aeróbico. / Pamella Gabriela dos Santos Ferreira. 2020.

72 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho (in memoriam).

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo, 25 de

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Pamella Gabriela dos Santos Ferreira

Título da Dissertação: "Estudo pré-clínico do efeito da terapia por arginina sobre a fadiga muscular, em modelo experimental de tre"

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MAF

Membro: PROF. DR. ANDRF

Membro: PF

*Ao querido professor e orientador Paulo de Tarso,  
pela sua confiança, dedicação  
e amor à pesquisa e ao ensino.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer é a parte fácil de toda essa jornada. Agradeço à Deus por tudo, aos meus pais por sempre me incentivarem a buscar conhecimento, pelo exemplo e privilégio de poder estudar desde sempre.

Aos meus irmãos Willian, Patricia e Ana Carolina pelo incentivo, carinho, confiança e amor. Em especial à minha irmã Patricia por ter o trabalho de revisar meu texto e meu inglês.

Ao meu marido por todo o companheirismo, paciência, incentivo, amor e carinho, principalmente nos dias que estive ausente para concluir este mestrado, sem a sua ajuda eu não teria conseguido.

Aos meus amigos Bárbara, João, Cláudia e Simone pela companhia de todas as quintas, por fazerem dos meus dias sempre mais felizes. Em especial à Bárbara por me ensinar e se dispor a me ajudar em absolutamente tudo.

A minha querida amiga e aluna de iniciação Jhenife por demonstrar tanta destreza e tanto amor à pesquisa, você sempre será uma inspiração para mim.

A querida Dominique pela sua amizade e por me ajudar com a histologia deste estudo, sem você não teria conseguido, sem vocês – Domi e Thiago.

À equipe do biotério da UNINOVE, Nurya, Vanessa e Thai que me ajudaram em período de férias e estiveram dispostas sempre a me ajudar.

Aos meus queridos amigos Ana Luisa, Keitty e Yuri que mesmo de longe sempre estão perto e preenchem meus dias com muita saudade e muito amor.

A minha amiga Kelly por me ajudar e incentivar em todos os plantões após aulas e experimentos e em muitos momentos de cansaço.

Ao professor Labat que esteve presente desde o início, me ensinando tanto e confiando em mim.

Por fim ao meu querido orientador Paulo de Tarso, que sempre me incentivou, confiou em mim, que me inspira a buscar mais conhecimento todos os dias e a ter responsabilidade sobre tudo aquilo que podemos fazer por nós e pelos outros.

## RESUMO

A fadiga muscular é o declínio do rendimento muscular ao executar uma ação e está diretamente ligada a diminuição da força muscular desencadeando uma série de reações bioquímicas com liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição da funcionalidade do músculo. A prática de exercício físico induz ao músculo alterações estruturais e metabólicas e corrobora a adaptação muscular, com melhora da força e resistência. A fim de prevenir efeitos deletérios da fadiga muitos recursos são utilizados, como a fotobiomodulação (PBMT) que atenua possíveis danos ligados ao estresse oxidativo e a suplementação com a L-Arginina, aminoácido precursor do óxido nítrico (NO) que possui ação vasodilatadora muscular e pode retardar ou prevenir a ocorrência da fadiga. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da PBMT associada ou não ao tratamento com L-Arginina sobre marcadores de estresse oxidativo, na lesão muscular e na fadiga muscular em modelo experimental de treinamento aeróbico. Foram utilizados 24 ratos Wistar divididos em 4 grupos, todos praticaram exercício aeróbico em esteira ergométrica por 30 minutos diários, 5 vezes na semana por 4 semanas e tiveram um período de adaptação do exercício de 2 semanas prévias. O grupo SHAM foi composto por animais que não receberam nenhum tipo de suplementação ou tratamento; L-ARG que receberam L-Arginina 100 mg/kg/dia antes do exercício; PBMT que foi utilizado laser com baixa intensidade prévio no músculo tibial anterior e L-ARG+PBMT que receberam suplementação com a L-Arginina 100mg/kg/dia e aplicação de PBMT no músculo tibial anterior previamente ao exercício. Após o protocolo de exercício todos os grupos foram submetidos a fadiga muscular induzida eletricamente, cada animal passou por 4 tetanias e então foi realizada a coleta de sangue e músculo, os animais foram eutanasiados e foram avaliados marcadores bioquímicos CK, LDH, MDA, SOD e GPx; força máxima obtida (Fmáx), contração basal (BC) e tempo de decaimento da força em 50% nos ensaios de contração tetânica induzida e foi feita análise histológica do músculo tibial anterior dos animais. Os níveis de CK e LDH foram reduzidos no grupo PBMT, o MDA foi elevado no grupo de associação PBMT e L-Arginina, demonstrando que sua associação não preveniu a lipoperoxidação, sendo menor nos grupos PBMT, L-Arginina e SHAM, se tratando da SOD os grupos PBMT e associação de PBMT e L-Arginina obtiveram níveis mais elevados demonstrando melhor ação antioxidante e GPx obteve níveis mais elevados nos grupos SHAM e PBMT+L-Arginina do que no grupo L-Arginina. A Fmáx, BC e o tempo de decaimento da força em 50% demonstraram que o uso de PBMT e L-Arginina otimizaram a força muscular e a resistência. A análise histológica não apresentou hipertrofia ou atrofia muscular. **Conclusão:** PBMT associada a L-Arginina apresenta efeito somatório no aumento da força de contração, durante contração tetânica. A PBMT reduz a fadiga muscular e reduz a lesão muscular pelo controle do estresse oxidativo.

Palavras-chave: fotobiomodulação; L-Arginina; exercício aeróbico; fadiga muscular; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Muscle fatigue is a decline in muscle performance and its directly linked to the decreasing of muscle strength, triggering a series of biochemical reactions with the release of reactive oxygen species (ROS) and decreasing of muscle functionality. The practice of physical exercise induces structural and metabolic changes to the muscle and corroborates to its adaptation, with improvement of strength and endurance. In order to prevent deleterious effects of muscle fatigue many resources are used, such as photobiomodulation therapy (PBMT), which attenuates possible damage linked to oxidative stress, and supplementation with L-Arginine, an amino acid that is a precursor of nitric oxide (NO) which has muscle vasodilator action and can delay or prevent the occurrence of muscle fatigue. The aim of this study was to evaluate the effects of PBMT associated or not with L-Arginine supplementation on markers of oxidative stress, muscle injury and muscle fatigue in an experimental model of aerobic training. Twenty-four Wistar rats were divided into 4 groups, all of them practiced aerobic exercise on treadmill for 30 minutes daily, 5 times a week for 4 weeks and had a period of adaptation of the exercise in 2 previous weeks. The SHAM group was composed of animals that did not receive any type of supplementation or treatment, L-ARG that received L-Arginine 100 mg/kg/day before exercise, PBMT that obtained previous treatment with PBMT on the anterior tibial muscle and L-ARG associated with PBMT which received supplementation with L-Arginine 100mg/kg/day and PBMT in the tibial muscle prior to exercise. After the exercise protocol, all groups were submitted to electrically induced muscle fatigue, each animal underwent 4 tetanic contractions, then the blood and muscle were collected, the animals were euthanized after and biochemical markers CK, LDH, MDA, SOD and GPx were evaluated; maximum strength obtained (Fmax), basal contraction (BC) and force decay time in 50% of the peak in the induced tetanic contraction assays and histological analysis of the anterior tibial muscle of the animals was performed. CK and LDH levels were reduced in the PBMT group, MDA was elevated in the PBMT and L-Arginine association group, demonstrating that its association did not prevent lipid peroxidation, being lower in the PBMT, L-Arginine and SHAM groups, SOD groups PBMT and association of PBMT and L-Arginine obtained higher levels demonstrating better antioxidant action and GPx obtained higher levels in the SHAM and PBMT + L-Arginine groups than the L-Arginine group. The Fmax, BC and the decay time of the force in 50% demonstrated that the use of PBMT and L-Arginine optimized muscle strength and endurance. Histological analysis did not present hypertrophy or muscular atrophy. **Conclusion:** the application of PBMT and association between PBMT and L-Arginine were effective in attenuating muscle fatigue and preventing muscle injury induced by aerobic exercise.

Keywords: photobiomodulation; L-Arginine; aerobic exercise; muscle fatigue; oxidative stress.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fibra do músculo esquelético – composição

Figura 2: A contração muscular – Fluxograma

Figura 3: Composição dos grupos experimentais e fases do experimento

Figura 4: Aplicação do laser no músculo tibial anterior – 5 pontos

Figura 5: Ensaio da contração tetânica

Figura 6: Delineamento e *Timeline* do protocolo experimental

Figura 7: Comparação da concentração dos níveis de CK no plasma de ratos submetidos a treinamento em esteira e posterior protocolo de fadiga do músculo tibial anterior por eletroestimulação.

Figura 8: Comparação da concentração dos níveis de LDH no plasma de ratos submetidos a treinamento em esteira e posterior protocolo de fadiga do músculo tibial anterior por eletroestimulação.

Figura 9: Comparação da concentração dos níveis de MDA no músculo tibial anterior de ratos submetidos a treinamento em esteira e posterior protocolo de fadiga por eletroestimulação.

Figura 10: Comparação da concentração de SOD no músculo tibial anterior de ratos submetidos a treinamento em esteira e posterior protocolo de fadiga por eletroestimulação.

Figura 11: Comparação da concentração de GPx no músculo tibial anterior de ratos submetidos a treinamento em esteira e posterior protocolo de fadiga por eletroestimulação.

Figura 12: Gráfico da avaliação da força máxima em cada contração tetânica comparando os grupos Sham (SHAM – em preto), L-Arginina (L-ARG - em vermelho), PBMT (PBMT – em verde) e associação entre PBMT e L-Arginina (PBMT + L-ARG – em azul).

Figura 13: Gráfico da avaliação do tempo em segundos da força decair em 50% do valor máximo, comparando os (SHAM – em preto), L-Arginina (L-ARG

- em vermelho), PBMT (PBMT – em verde) e associação entre PBMT e L-Arginina (PBMT + L-ARG – em azul).

Figura 14: Gráfico da avaliação da força de contração basal mantida entre as contrações tetânicas comparando os grupos SHAM (SHAM – em preto), L-Arginina (L-ARG - em vermelho), PBMT (PBMT – em verde) e associação entre PBMT e L-Arginina (PBMT + L- ARG – em azul).

Figura 15: Representativas do protocolo de fadiga muscular induzida eletricamente, sendo produzidas quatro curvas correspondentes as tetanias.

Figura 16: Grupo SHAM, figuras representativas demonstrando achados histológicos.

Figura 17: Grupo PBMT, figuras representativas demonstrando achados histológicos.

Figura 18: Grupo L-Arginina, figuras representativas demonstrando achados histológicos.

Figura 19: Grupo associação PBMT e L-Arginina, figuras representativas demonstrando achados histológicos

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de irradiação com PBMT

## **LISTA DE SIGLAS E UNIDADES DE MEDIDAS**

ADP- adenosina difosfato

ATP- adenosina trifosfato

BC - contração basal

CAT – catalase

CK – creatina quinase

EROs - espécies reativas de oxigênio

Fmax – força máxima

GPx - glutathione peroxidase

GSH - glutathione reduzida

H&E - Hematoxilina e eosina.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

J – joules

L-Arg – L-Arginina

LBI - laser de baixa intensidade

LDH – Lactato desidrogenase

LED - Light Emitting Diode

MDA – malondialdeído

mL- mililitro

mW- miliwatts

NADPH - fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

nm- nanometro

NO - óxido nítrico

NO<sub>x</sub> – razão nitrito/nitrato

O<sub>2</sub> - oxigênio

PBMT – fotobiomodulação

RF - Resistência a fadiga

SNC - sistema nervoso central

SOD - superóxido dismutase

TBARS - ácido tiobarbitúrico

UMs - unidades motoras

μL- microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2. CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>16</b>
2.1. TECIDO MUSCULAR	16
2.2. MORFOLOGIA	16
2.3. CONDUÇÃO NERVOSA	18
2.4. MECANISMO DE CONTRAÇÃO MUSCULAR	20
2.5. FADIGA MUSCULAR	21
2.6. TIPOS DE FADIGA MUSCULAR	22
2.7. PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO	24
2.8. L-ARGININA	27
2.9. FOTOBIMODULAÇÃO POR LASER DE BAIXA INTENSIDADE	27
2.9.1. HISTÓRIA DO LASER	27
2.9.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	29
2.9.3. EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE	29
2.9.4. APLICAÇÕES DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE	29
2.9.5. LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA FADIGA MUSCULAR	30
<b>3. OBJETIVO GERAL</b>	<b>32</b>
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	33
4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	33
4.3. CÁLCULO AMOSTRAL	35
4.4. ADMINISTRAÇÃO DE L-ARGININA	35
4.5. APLICAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO POR LASER DE BAIXA INTENSIDADE	35
4.6. PROTOCOLO DE EXERCÍCIO	36
4.7. CONTRAÇÃO TETÂNICA POR ELETROESTIMULAÇÃO	37
4.7.1. PREPARAÇÃO ANIMAL	37
4.7.2. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PARA INDUÇÃO DE FADIGA MUSCULAR	37

4.7.3. PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE A CONTRAÇÃO TETÂNICA	38
4.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	40
4.8.1. CREATINA QUINASE (CK)	40
4.8.2. LACTATO DESIDROGENASE (LDH)	40
4.8.3. MALONDIALDEÍDO (MDA)	40
4.8.4. SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	41
4.8.5. GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)	41
4.9. HISTOLOGIA	42
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>44</b>
5.1. CREATINA QUINASE (CK)	44
5.2. LACTATO DESIDROGENASE (LDH)	45
5.3. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR MALONDIALDEÍDO (MDA)	46
5.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR MEIO DOS NÍVEIS DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	47
5.5. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)	48
5.6. AMPLITUDE DA FORÇA MÁXIMA DE CONTRAÇÃO NA CONTRAÇÃO TETÂNICA	49
5.7. TEMPO DE DECAIMENTO DA FORÇA EM 50% DA FORÇA MÁXIMA DURANTE A CONTRAÇÃO TETÂNICA	50
5.8. AMPLITUDE DA CONTRAÇÃO BASAL	51
5.9. ENSAIO DE CONTRAÇÃO TETÂNICA PARA CADA GRUPO EXPERIMENTAL	52
5.10. ANÁLISES HISTOLÓGICAS	53
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>65</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>73</b>
9.1. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	73

## 1 INTRODUÇÃO

O declínio do rendimento muscular ao executar uma ação é denominado fadiga muscular. A fadiga muscular está diretamente ligada a diminuição da força do músculo ao gerar uma contração por determinado tempo, desencadeando uma série de reações bioquímicas com formação de lactato, alteração do pH do tecido, liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição da funcionalidade do músculo (1, 2).

Para avaliar características celulares do músculo em fadiga ressaltam-se algumas enzimas relacionadas ao trabalho muscular como a creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH). A atividade da CK tem se mostrado como o melhor indicador de aumento da intensidade do exercício e possível ocorrência de lesão muscular e seu aumento no sangue é dependente de lesões musculares em sarcômeros tanto por exercício extenuante voluntário como por alterações musculares patológicas (3, 4, 5).

A fadiga muscular tem repercussões deletérias ao tecido, por conta disso diversas estratégias e recursos são utilizados a fim de prevenir ou amenizar a mesma, dentre os quais a suplementação com componentes como a L-Arginina e a aplicação da fotobiomodulação (PBMT), que é o uso da luz na modulação de reações celulares e busca retardar a cadeia bioquímica responsável pela ocorrência da fadiga e melhorar o rendimento muscular (2, 6, 7, 8, 9).

Estudos em modelo animal têm demonstrado resultados positivos do uso da PBMT no rendimento muscular (10). Sua aplicação em atletas baseia-se na prevenção de suas injúrias antes da realização do exercício, assim como atenuar suas implicações no músculo esquelético após o exercício aeróbico ou resistido, comparando diversas aplicações da PBMT como a laserterapia de baixa intensidade, laser pulsado, LED, com diferentes parâmetros e frequências de aplicação (2, 7, 11, 12).

## 2 CONTEXTUALIZAÇÃO

### 2.1- O TECIDO MUSCULAR

Os músculos compõem em média 50% do peso corporal, sendo 40% músculo esquelético e 10% músculos liso e cardíaco. Abordaremos mais a fundo o músculo esquelético, sua composição, função e disposição no corpo humano (13).

### 2.2- MORFOLOGIA

O músculo esquelético é composto por fibras musculares com diâmetro de 10 a 80 micrômetros, que se estendem por todo o seu comprimento e são inervadas por uma ou, em minoria, mais de uma terminação nervosa localizada próximo a parte média da fibra muscular, formando a chamada unidade motora (14).

As fibras musculares são formadas pelas estruturas: sarcolema, miofibrilas, discos Z, sarcoplasma e retículo sarcoplasmático. Cada uma dessas estruturas tem sua composição química e função na contração muscular (15).

As fibras musculares são multinucleadas e cada núcleo dentro de uma fibra muscular controla o tipo de proteína sintetizada nessa região específica da célula. Estas regiões são conhecidas como domínios nucleares e têm um tamanho altamente regulamentado, mas não constante (16).

A unidade motora, que é inervação da fibra muscular pela fibra nervosa, é responsável por transmitir o estímulo do sistema nervoso central ao músculo para que ocorra a contração propriamente dita. As fibras musculares interagem entre si em cada unidade motora e se superpõem, sendo possível a contração de um grupamento muscular em detrimento de outro que esteja ao seu lado, ou seja, são completamente independentes (13, 14).

Cada fibra muscular contém centenas a milhares de miofibrilas e cada uma delas é composta por 1.500 filamentos de miosina para 3.000 de actina, e a estabilização desta disposição celular é feita pela molécula titina (14).

A miosina é uma proteína abundante no tecido muscular, expressa em células musculares estriadas e compõe aproximadamente 25% do total de proteínas no tecido (14).



A miosina tem uma composição polipeptídica com duas cadeias pesadas cujo porções carboxi-terminais formam uma haste de bobina enrolada  $\alpha$ -helicoidal (a "cauda") enquanto as duas porções aminoterminais separadas formam dois domínios globulares alongados (as "cabeças") e essas cadeias entrelaçadas ajudam a estabilizar o movimento através da interação entre as moléculas mais leves sobre as mais pesadas. (14, 17).

O filamento de actina é composto por proteínas distintas que são a troponina, tropomiosina e a actina, formando um arcabouço entrelaçado entre essas moléculas que também formam uma dupla hélice, cada uma contando com actina G polimerizada a qual possui uma molécula de ADP presa. Essa disposição das moléculas dá origem aos chamados locais ativos do filamento, que interagem no momento da contração muscular (14, 16).

O aspecto estriado do músculo esquelético se dá ao entrelaçamento das miofibrilas com os discos Z, que são compostos por proteínas filamentosas e passam pelas miofibrilas em diversas direções ligando-as. Microscopicamente pode-se observar a formação de faixas e das pontes cruzadas, onde ocorre a interação dos filamentos de actina e miosina, dando ao músculo a interação necessária para que o potencial de ação possa ser transmitido (18).

Todas as miofibrilas dispõem-se suspensas no sarcoplasma – matriz intracelular, e este líquido sarcoplasmático contém potássio, magnésio, fosfato e algumas proteínas, além de inúmeras mitocôndrias. Dentro desta matriz intracelular ainda podemos contar com um retículo sarcoplasmático, que apresenta muita importância no controle da contração muscular (14).

A classificação dos tipos de fibras musculares originalmente foi baseada na cor: no vermelho (mioglobina elevada) e no branco (menor quantidade de mioglobina). Pode ser correlacionada com a velocidade da contração (lenta e rápida, respectivamente) e resistência a fadiga (maior resistência e menor, respectivamente) (18).

Algumas diferentes formas de classificar as fibras musculares surgiram, uma baseada em propriedades moleculares e coloração histológica para atividades metabólicas de enzimas - oxidativo lento, glicolítico lento; oxidativo rápido,

glicolítico rápido – baseado na labilidade do pH, a coloração da ATPase, com fibras classificadas como tipo I, IIa, IIb, IIx (18).

Fonte: Zalpour *et.al.* 2005.

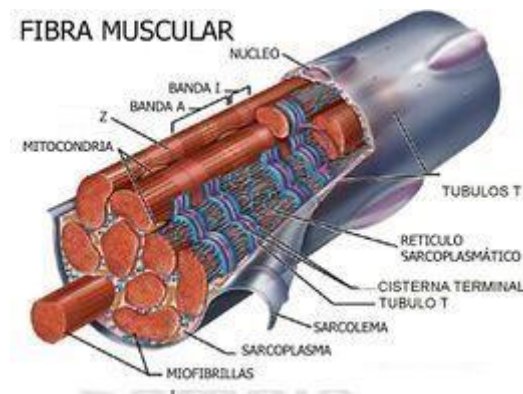


Figura 1: Fibra do músculo esquelético – composição

### 2.3- CONDUÇÃO NERVOSA

A membrana muscular tem uma disposição elétrica na qual, basicamente, o meio externo é positivo e o interno negativo, devido a composição química dos meios, contando com íons sódio, potássio e principalmente cálcio (19).

Para que ocorra a contração muscular é necessário que haja o disparo de um potencial de ação e o mesmo possa ser transmitido até o sítio responsável pela execução do movimento. O nervo motor, que se estende até terminações nervosas presentes nas fibras musculares, transmite o potencial de ação e, em suas terminações nervosas secreta o neurotransmissor acetilcolina. A interação entre o nervo motor e o músculo forma a unidade motora (14, 19).

A acetilcolina atua na abertura de canais que alteram o potencial da membrana fazendo com que sódio, presente neste meio molecular externo, flua para o interior da membrana muscular, gerando um potencial de ação na fibra, havendo a despolarização da membrana e a transmissão do potencial de ação para dentro da fibra muscular, desencadeando a liberação de íons Cálcio pelo retículo sarcoplasmático a fim de estabilizar este meio (14).

Os íons cálcio geram forças atrativas entre os filamentos de actina e miosina, ocorrendo o deslizamento de um sobre o outro, ocasionando a contração muscular. Em seguida os íons cálcio são bombeados novamente para dentro do retículo sarcoplasmático permanecendo armazenados até que outro potencial de ação seja gerado e repita o processo (14, 19).



Figura 2: A contração muscular – Fluxograma

## 2.4- MECANISMO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR

A contração muscular envolve diversos componentes e é muito complexa. As fibras musculares são agrupadas em paralelo executando um movimento no comprimento do músculo, do osso ao osso. Em contrações de músculos voluntários sua ativação ocorre através de complexos caminhos iniciados no córtex cerebral, levando o potencial de ação até os neurônios motores presentes na medula espinhal (10, 20).

Nem todos os músculos têm a mesma conformação, sua anatomia microscópica e macroscópica difere em número e direção de fibras, tamanho do agrupamento, origem e inserção no osso, o que pode divergir em funções

da contração muscular ativada para que o movimento desejado possa ser desenvolvido (21).

A expressão contrátil do músculo é composta pelos filamentos executores do movimento que são actina e miosina e seu movimento de deslizar uma sobre a outra, e para que isso ocorra necessitamos de energia, fornecida pelo consumo do ATP (14).

A ATP pode ser obtida por três fontes de energia. A primeira fonte de energia conhecida é a substância fosfocreatina, que é clivada instantaneamente e a energia liberada ocorrendo a reorganização da molécula de ADP para a reconstituição da molécula ATP (14).

A segunda fonte de energia é o glicogênio, que é previamente armazenado nas células musculares e quando fracionado por componente enzimático o produto é ácido pirúvico e ácido láctico, os quais promovem energia suficiente para converter a molécula de ADP presente nas fibras musculares em ATP – chamado mecanismo de glicólise que pode ocorrer na ausência de oxigênio (22).

A terceira e última fonte de energia é o metabolismo oxidativo, que acontece através de uma combinação do oxigênio com vários nutrientes celulares para a liberação de ATP. A contração prolongada é suprida em sua maioria por esta última fonte de energia (14, 22).

## 2.5- FADIGA MUSCULAR

A fadiga muscular ocorre quando um músculo ou um grupamento muscular é ativado de forma intensa, apresentando um declínio temporário na força e potência do mesmo devido a atividade muscular (10, 23).

A fadiga pode ocorrer em nível periférico ou do sistema nervoso central (SNC) – a chamada fadiga central. A fadiga muscular periférica pode ser definida como uma redução na capacidade de geração de força induzida pelo trabalho muscular esquelético e afeta os mecanismos eletroquímicos e mecânicos da junção neuromuscular para a transmissão de força no ponto de inserção do tendão (24, 25, 26).

A fadiga muscular central pode ocorrer como uma redução na ativação voluntária de neurônios motores devido à deficiência de unidade neural, comprometimento da propagação do potencial de ação, ativação incompleta da unidade motora e falta de motivação ou tolerância à dor (27).

Músculos possuem diversos tamanhos e funções biomecânicas, cada grupamento demanda e desprende uma quantidade de energia, transitando da contração mais rápida e envolvendo menos fibras musculares, até a contração de grupos musculares extensos como o quadríceps femoral. Para a realização de um movimento os tipos de contração muscular também divergem (14).

Estudos sobre a fadiga muscular são recentes, ainda há muito o que descrever e acrescentar ao tema. Desde o início do século XX o estudo do tecido muscular desperta interesse de estudiosos. Em 1904 Mosso *apud* Aagard *et al.* (2002) foi o responsável por introduzir um estudo experimental com ilustrações de músculos em contração muscular rápida quando um dedo eleva um peso determinado (10).

Um estudo experimental realizado por Hill e Kupalov (1929) *apud* Aagard *et al.* (2002) com sapos sugeriu que o acúmulo de ácido láctico estaria diretamente ligado a ocorrência da fadiga muscular (10).

Assim sendo, continuamos a buscar entendimento sobre a fadiga muscular e considera-se que o controle muscular tem sua origem na unidade motora. Elucida-se a importância de analisar as propriedades fisiológicas das unidades motoras (UMs) ao tentar compreender e prever a fadiga muscular (14, 27).

Com o questionamento do que compreende a fadiga muscular, Potvin e Fuglevand (2017) buscaram desenvolver um modelo de fadiga muscular da unidade motora, não apenas para traçar um tratamento, mas principalmente para prever os aspectos mecânicos em uma ampla série de tarefas e ilustrar as respostas variáveis das unidades motoras, cuja ação contribui para a trajetória das mudanças na capacidade da força muscular durante atividade motora (28).

## 2.6- TIPOS DE FADIGA MUSCULAR

A fadiga é um sintoma não específico associado a muitas condições de saúde. Existem alguns métodos diferentes de classificação de fadiga, o primeiro é de acordo com sua duração - fadiga aguda e fadiga crônica (19).

A fadiga aguda pode ser rapidamente aliviada pelo descanso ou mudanças no estilo de vida, enquanto a fadiga crônica é uma condição definida como um cansaço persistente que dura meses e não é amenizado pelo descanso (19).

Há também outros dois tipos de fadiga muscular descritos na literatura: fadiga periférica e a fadiga central. Na ocorrência da fadiga muscular periférica pode-se ressaltar alguns mecanismos: alterações na transmissão do potencial de ação - transmissão sináptica, alterações no sarcolema na propriedade de propagação de potencial de membrana e liberação do íon cálcio ao retículo sarcoplasmático, acoplamento, recaptação de cálcio (26,27).

Entre os fatores mecânicos a fadiga periférica parece influenciar na transmissão da força do músculo para o tendão, alterando as propriedades mecânicas da interação entre o músculo, tendão e outros tecidos em torno de uma articulação como, por exemplo, alterando viscoelasticidade e rigidez do sistema (26, 29).

Este tipo de fadiga muscular manifesta-se como um prejuízo na ativação dos neurônios motores que impulsionam as fibras musculares. Existem vários fatores que contribuem para isto, como o aumento da inibição sináptica direcionada para os neurônios motores e adaptações intrínsecas em neurônios motores que os tornam progressivamente menos responsivos à excitação sináptica durante a atividade sustentada (22).

Quando a fadiga muscular resulta de uma redução na capacidade do sistema nervoso central em ativar o músculo para que ocorra a contração muscular trata-se de fadiga muscular central, que envolve o consumo do glicogênio pelos astrócitos, mecanismo que pode estar diretamente ligado com este tipo de fadiga (10).

Dentre as causas possíveis a principal pode ser a ocorrência de prejuízos após a ponte e na função e desenvolvimento da fase de excitação-contração

provocada pelo acúmulo de metabólitos e alterações nas concentrações iônicas transmembranas (10, 28).

Allen *et. al.* (10) especificando os tipos de fadiga muscular, descrevem que a fadiga muscular periférica de alta frequência consiste em um estímulo contínuo no músculo com uma força máxima. Neste tipo de fadiga a recuperação do músculo é muito rápida e pode ocorrer quando um indivíduo levanta um objeto muito pesado, como um piano.

Outro tipo de fadiga muscular pode derivar da chamada tetania curta, um estímulo repetido no músculo, porém os protocolos existentes para estudar esse tipo de fadiga não são uniformizados, variando no tempo de contração muscular e na frequência do estímulo durante a tetania (10).

#### 2.6.1. CONTRAÇÃO TETÂNICA

A quantidade de abalos musculares individuais pode ser mensurada através da somação, fenômeno que ocorre aumentando o número de unidades motoras que se contraem simultaneamente – somação de múltiplas fibras, ou aumentando a frequência da contração muscular – somação de frequência. Com a somação de frequência pode haver o fenômeno denominado tetanização (14).

A tetania ocorre quando o músculo recebe pelo menos vinte impulsos por segundo e as contrações tendem a se fundir, então o músculo praticamente não é capaz de relaxar em meio aos impulsos (13).

Sua ocorrência se deve a liberação adicional de íons cálcio que resulta do estímulo subsequente, enquanto os íons de cálcio liberados pelo impulso anterior ainda não voltaram aos seus depósitos, isso provoca uma série de contrações que se fundem umas com as outras – as chamadas contrações tetânicas (30).

## 2.7. PRÁTICA DO EXERCÍCIO FÍSICO

A realização do exercício físico é caracterizada pela repetição regular e frequente de contrações musculares de determinada intensidade e duração. O treinamento induz ao músculo significativas alterações estruturais e metabólicas que são inerentes ao tipo de exercício específico. Várias vias de sinalização são ativadas durante o exercício físico, podem ser identificadas e contribuem para que ocorra o crescimento e adaptação muscular (16).

A prática de exercício físico pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes tipo 2, declínio cognitivo e outras doenças e condições crônicas. Muitos aspectos sobre a prática do exercício têm sido pontuados, inclusive a melhora da dispneia e capacidade pulmonar em pacientes obesos, melhora da capacidade cognitiva e da memória (31, 32).

O rendimento da capacidade muscular e respiratória do atleta é de extrema importância, portanto diversos estudos buscam analisar fatores que podem levar a diminuição da função muscular e danos a fim de preveni-las, analisando aspectos fisiológicos e físicos da prática de atividade física (33, 34).

A ocorrência da fadiga muscular está diretamente ligada a intensidade do exercício praticado, seja ele aeróbico ou resistido, a capacidade e o metabolismo do músculo que está realizando a ação. A depleção de glicogênio muscular está diretamente ligada ao rendimento do atleta ou indivíduo, o que pode gerar um declínio da contração muscular e diminuição dos potenciais de ação do SNC para o músculo (11).

Quando a realização do exercício físico gera algum dano muscular pode-se notar alguns aspectos fisiológicos, daí a importância de avaliar marcadores inflamatórios como o aumento da CK, aumento do número de leucócitos, LDH, carbonilação de proteínas, ácido úrico, proteína C-reativa e variações de dor muscular tardia (DMT) (35).

Danos musculares estão associados a uma resposta inflamatória que pode persistir por semanas. As células inflamatórias e moléculas de sinalização mediam o processo de reparação que acontece durante a recuperação de alta intensidade ou exercício prejudicial, assim, a resposta inflamatória induzida por danos musculares pode ser uma resposta funcionalmente benéfica (36).



As EROs permanecem em baixo nível no músculo esquelético em repouso, mas aumentam em resposta à atividade contrátil. Os produtos EROs levam à oxidação de ácido proteico, lipídico ou nucléico acompanhados de uma diminuição acentuada da capacidade antioxidante, assim, induzindo a fadiga (19).

Alguns biomarcadores são promissores para avaliar danos oxidativos na fadiga muscular, incluindo biomarcadores lipídicos de peroxidação, ou seja, substâncias tiobarbitúricas ácido-reativa e isoprostanos, e biomarcadores de oxidação de proteínas (37).

Os biomarcadores para avaliar a capacidade antioxidante incluem as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e marcadores antioxidantes como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O aumento do estresse oxidativo induz efeitos deletérios sobre a plasticidade estrutural e resistência celular, principalmente através da indução de peroxidação lipídica nas membranas, proteínas e genes (19, 37).

Os indicadores de peroxidação lipídica e estresse oxidativo se formam durante a decomposição de produtos lipídicos de peroxidação, que reagem com ácido tiobarbitúrico e formam um aduto vermelho fluorescente(37).

Isoprostanos são compostos semelhantes à prostaglandina derivados da peroxidação de ácidos graxos essenciais catalisados pelas EROs, a GPx e catalase são enzimas que catalisam peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e com o aumento da intensidade do exercício, os níveis de TBARS, CAT e GPx aumentam (19).

Para avaliar a recuperação do músculo após a prática de exercício, além dos biomarcadores, utilizam-se também os testes funcionais que avaliam a força, contração máxima do músculo, resistência muscular e a fadiga muscular. Esta avaliação minuciosa é necessária para posterior traçado de protocolos de prevenção e de recuperação muscular (11, 38, 39).

Estudos relacionados à prática de atividade física e prevenção de danos musculares apontam diversas estratégias, alguns ensaios clínicos randomizados controlados avaliaram terapias como massagens, liberação miofascial, recuperação ativa, estimulação elétrica muscular, crioterapia, PBMT, bandagens elásticas e suplementação alimentar. Dentre estas terapias

destacamos o uso da PBMT e da suplementação com a L-Arginina (22, 40, 41, 42, 43, 44, 45).

Assevera-se que as modalidades terapêuticas citadas não englobam todas as utilizadas, mas muito apontadas em estudos científicos. Observa-se a crescente investigação da aplicação da PBMT na prevenção e atenuação da fadiga muscular, ressaltando-se a importância de investigar os efeitos de modalidades terapêuticas na recuperação do tecido muscular através de marcadores bioquímicos (33).

## 2.8. L-ARGININA

A suplementação com L-Arginina é uma das estratégias adotadas por atletas, a fim de prevenir a fadiga muscular. Este aminoácido é considerado condicionalmente essencial, visto que, por não ser produzido pelo próprio organismo em algumas fases da vida e sob certas condições patológicas, necessita ser adquirido através da dieta (46, 47).

O óxido nítrico é formado a partir da L-Arginina e possui ação vasodilatadora, o que pode promover a redução da fadiga muscular. A vasodilatação resulta em aumento da perfusão muscular e maior oferta de glicose pelos músculos em atividade, sendo que o efeito da perfusão da musculatura esquelética pode contribuir para melhorar o rendimento muscular durante a prática de atividade física, aumento de massa muscular e da força contrátil devido a síntese de proteínas (40, 47).

Para compreender os efeitos do exercício físico em animais de laboratório, este estudo utilizou L-Arginina em animais treinados na esteira motorizada, simulando os programas de reabilitação e treinamento físico, com o intuito de se investigar alterações na fibra muscular, como hipertrofia (48, 49).

## 2.9. FOTOBIMODULAÇÃO POR LASER DE BAIXA INTENSIDADE

### 2.9.1- HISTÓRIA DO LASER

O estudo da luz e sua interação com o meio foi documentado desde antes do início do estudo da óptica ser tratado como ciência, considerando a premissa de Aristóteles no século IV A.C. de que a luz era essencialmente a qualidade accidental dos corpos transparentes e que tinha características de onda, passando pela descrição do matemático Euclides sobre as leis da reflexão e refração, contando com um avanço dos estudos da óptica e da luz por estudiosos ao longo dos anos (50, 51, 52).

Em 1917 Albert Einstein propôs a possibilidade do fenômeno intitulado “emissão estimulada”, processo físico fundamental para o desenvolvimento do LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) – acrônimo somente criado por Gould em 1957. A partir deste postulado foi possível o desenvolvimento do primeiro aparelho, o maser, em 1960 por Theodore Maiman (53, 54, 55, 56).

O desenvolvimento do laser em 1960 revolucionou a precisão e o controle da entrega da luz devido a distinções das fontes de luz, os fótons eram emitidos na mesma fase (coerentes); a faixa de comprimento de onda era muito estreita (tornando a luz monocromática); e o feixe direcional (bem colidido), portanto, poderia ser firmemente focado (53).

O reconhecimento do potencial do laser para terapias diversas foi quase imediato. Houve relatos da aplicação do laser de rubi (694 nm comprimento de onda) impressionantes e também preocupantes devido as queimaduras na retina que eram intensas porque o comprimento de onda vermelho (694 nm) era mal absorvido por melanina e sangue, o fechamento vascular não poderia ser produzido sem hemorragia ou cicatrizes intensas (53, 55).

A descoberta do laser de argônio em 1964 (Pontes, 1964) forneceu azul (488-nm) e verde (514-nm) com os respectivos comprimentos de onda, que tinham a vantagem de ser fortemente absorvidos pela hemoglobina e pela melanina.

Estudos sobre a aplicação do laser argônio estavam em andamento (L'Esperance, 1968), com vários sistemas de entrega, incluindo biomicroscopia (L'Esperance 1969). Mais progresso foi alcançado quando o laser foi acoplado a uma lâmpada de fenda (57), fornecendo um feixe de mira e controle preciso do tamanho da mancha, localização, potência e duração de exposição.

Uma série de artigos clínicos em 1971 sinalizou tanto a disseminação quanto aceitação da nova tecnologia (58, 59), e o progresso contínuo na compreensão das interações e avanços do laser-tecido em tecnologias laser, juntamente com descobertas de várias vias de resposta tecidual, continuam avançando.

### 2.9.2- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

O laser é caracterizado pela emissão de um feixe de luz coerente, monocromático e colidido. As interações com tecidos biológicos são influenciadas por diferentes propriedades, comprimento de onda, grau de penetração do tecido e como a energia é emitida (contínua ou pulsada), influenciando o grau de absorção da energia a nível tecidual, condicionando sua conversão em energia térmica, com conseqüente aumento da temperatura dos tecidos (54).

### 2.9.3- EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Para discorrer sobre os efeitos do laser é válido conceituar a fotoquímica e fotobiologia. A fotobiologia inclui todos os fenômenos biológicos que envolvem a radiação não ionizante (Constitution of american Society for Photobiology) e trata do resultado das mudanças químicas e físicas induzidas pelos fótons, já a fotoquímica trata das alterações químicas que ocorrem nas moléculas após a absorção direta da energia dos fótons (56).

No entanto, esses efeitos não são totalmente conhecidos em tecidos como a pele, músculo, osso e nervo. Além disso, fatores como comprimento de onda, dose de irradiação a laser, frequência de tratamento (dias por semana) e locais de aplicação podem influenciar nos resultados terapêuticos (60).

Os mecanismos da PBMT são principalmente apontados pelo aumento da atividade mitocondrial e síntese de ATP, seguida de aceleração da resolução da inflamação (61).

#### 2.9.4- APLICAÇÕES DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

A PBMT ocorre através da aplicação de luz monocromática ou de banda estreita em tecidos e pode influenciar na atividade celular por estimulação ou inibição de funções químicas e fisiológicas. A magnitude do efeito da PBMT depende do comprimento de onda, da densidade energética (ou fluência), tipo de lesão e do espectro de absorção do fotorreceptor (11).

A PBMT têm sido utilizada para acelerar o processo de cicatrização de feridas e demais lesões cutâneas (62), na modulação do processo inflamatório (11, 63), auxiliar na modulação do sistema imunológico e controlar a dor (64), dentre outras aplicações em tecidos biológicos que seguem a premissa de um mecanismo importante de interação da luz com tecidos biológicos, que os fótons não podem causar efeitos térmicos no tecido biológico alvo (11).

A aplicação do laser também tem apresentado resultados significativos no aumento do desempenho muscular e na redução de sinais de fadiga muscular, demonstrado em ensaios clínicos e modelos experimentais (6, 65, 66).

#### 2.9.5- LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA FADIGA MUSCULAR

A PBMT fornece vários benefícios para o tecido muscular como a prevenção de danos ao músculo após o exercício, incluindo dor muscular de início tardio (DOMS), melhora da resistência à fadiga, atividade funcional, atlética e recuperação mais rápida após a prática de exercício físico (12).

Os mecanismos envolvidos em resultados positivos do uso de PBMT em tecido muscular não são totalmente claros, mas estudos sugerem que a aplicação de PBMT em tecido muscular pode atenuar o aumento de fatores pró-inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interleucina (IL-1 $\beta$ ),

bem como aumentar citocinas anti-inflamatórias como interleucina 10 (IL-10) (67, 68).

O uso de PBMT em danos musculares e no retardo da fadiga foi apontado no estudo pioneiro de Lopes- Martins *et. al.* (69) em modelo animal. Leal-Junior *et. al.* (11) demonstraram resultados positivos consistentes a aplicação de PBMT atenuando a fadiga muscular, principalmente quando o tratamento foi realizado antes da prática de exercício.

Em estudo realizado por Leal-Junior *et. al.*(11) foi demonstrado que a aplicação de PBMT possui efeito de proteção contra danos musculares, comparando grupos de indivíduos que realizaram exercício aeróbico e previamente PBMT e placebo, comparando os níveis de LDH, CK, peroxidação lipídica e a atividade enzimática da SOD, e seus resultados sugerem que a PBMT pode proteger o músculo dos efeitos deletérios do estresse oxidativo.

Durante o esforço aeróbico do exercício ocorre ruptura de proteínas do organismo, havendo então liberação de aminoácidos. Assim sendo, atletas podem necessitar de um aumento na ingestão de proteínas e de alguns aminoácidos específicos como a L-Arginina, que tem sido relacionada com a melhora do desempenho muscular por redução da fadiga, efeito ligado a sua ação vasodilatadora (70).

A justificativa deste estudo está na falta de fundamentação sobre a aplicação da PBMT conjuntamente com a suplementação de L-Arginina na realização de exercício aeróbico, pois esta associação não está firmemente compreendida, apesar de sabermos dos efeitos da PBMT na fadiga muscular e da ação da L-Arginina, os estudos realizados com a PBMT e a L-Arginina estão ligados ao endotélio, óxido nítrico e reparação epitelial e tecidual, sem se atentar a sua ação a nível de músculo esquelético (71, 72).

### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da terapia de fotobiomodulação associada ou não ao tratamento com L-Arginina sobre marcadores de estresse oxidativo, na lesão muscular e na fadiga muscular em modelo experimental de treinamento aeróbico.

#### **3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ↓ Comparar os níveis de creatina quinase, lactato desidrogenase, superóxido dismutase, malondialdeído e glutathione peroxidase;
- ↓ Determinar a amplitude da força durante a contração basal (BC) bem como durante as quatro contrações tetânicas induzidas (Fmax);
- ↓ Avaliar a resistência a fadiga (RF) traduzida no tempo necessário para que a Força de contração atinja 50% da força máxima.
- ↓ Verificar as alterações histológicas, como ocorrência de hipertrofia ou atrofia, infiltrados inflamatórios e indicadores de lesão muscular.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 24 ratos (*norvergicos albinus*), de linhagem Wistar, machos com idade de 90 dias e peso corporal variando de 350 a 450 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho- UNINOVE, mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, com água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à avaliação do Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho e aprovados (CEUA 7500280618), estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e aos padrões de experimentação animal do International Council for Laboratory Animal Science.

### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 24 animais foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos distintos, contendo 6 animais em cada grupo, sendo que: Grupo SHAM – que realizaram exercício aeróbico (esteira ergométrica) e não receberam nenhum tipo de suplementação ou tratamento; Grupo L-Arg realizaram exercício aeróbico (esteira ergométrica) e receberam L-Arginina 100 mg/kg/dia 30 minutos antes da atividade física durante 4 semanas da prática de exercício antes de serem submetidos ao protocolo de fadiga por eletroestimulação; Grupo PBMT foi composto por animais que realizaram exercício aeróbico (esteira ergométrica) e receberam terapia por fotobiomodulação (PBMT) e Grupo associação PBMT e L-Arg que realizaram exercício aeróbico (esteira ergométrica) e receberam suplementação com a L-Arginina 100mg/kg/dia 30 minutos antes da atividade física associada a PBMT. Todos os grupos foram submetidos a fadiga muscular induzida eletricamente após o protocolo de 4 semanas de exercício (Figura 3).



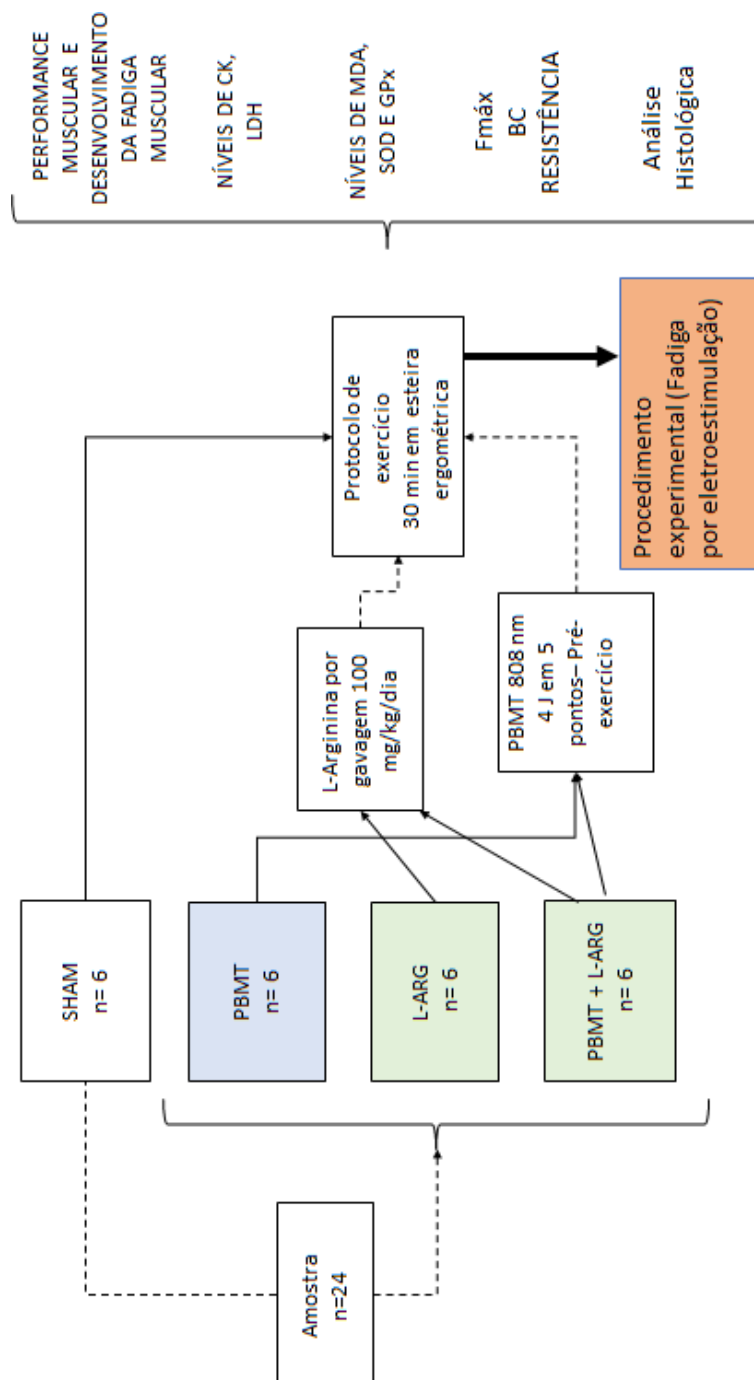


Figura 3. Composição dos grupos experimentais e fases do experimento

### 4.3 CÁLCULO AMOSTRAL

Para compor os grupos experimentais do projeto foi realizado um cálculo amostral com base nos estudos de Lopes-Martins, *et. al.*, (69) e Ramos *et. al.*, (73), considerando a aplicação do teste estatístico ANOVA para 3 tratamentos, com poder de teste de 80 e nível alfa de 0,05 resultando em uma amostra mínima de 24 animais, sendo 6 por grupo.

### 4.4 ADMINISTRAÇÃO DE L-ARGININA

Os animais foram submetidos a suplementação por meio de L-Arginina por gavagem sendo administrado 1 grama de L-Arginina em 10 mL de água destilada, a partir do peso de cada animal, sendo que foi administrado 100 mg/kg/dia ( 0,4 microlitros a cada animal do grupo L-Arginina e L-Arginina e PBMT) a administração se deu 30 minutos antes da realização do protocolo de exercício físico como sugerido pelo fabricante, a dose seguiu protocolo estabelecido por Ramos *et. al.* (73).

### 4.5 APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Foi utilizado o Laser da marca DMC® modelo Photon Laser III, com potência de 100 mW, área do feixe de 0,028cm<sup>2</sup>, irradiância de (1,7 W/cm<sup>2</sup>), comprimento de onda de  $\lambda$  808nm, meio ativo de Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP). A aplicação foi realizada sob forma de cinco pontos, pelo método transcutâneo nas porções do músculo tibial anterior (figura 4) com energia de 4 joules por ponto, tempo de 40 segundos por ponto e exposição radiante de 142 J/cm<sup>2</sup>, com entrega de energia total de 20 joules.



Figura 4 – Aplicação do laser no músculo tibial anterior – 5 pontos.

Os parâmetros utilizados estão descritos abaixo (tabela 1). A aplicação foi iniciada 30 minutos antes da realização de exercício na esteira - protocolo de exercício por 4 semanas, 5 dias por semana, sendo que estes animais foram treinados por 2 semanas anteriores por 2 vezes na semana a fim de aderir ao protocolo de exercício, totalizando 6 semanas de treino.

Tabela 1. Parâmetros de irradiação com PBMT.

Grupos	$\lambda$ (nm)	Área de spot (cm <sup>2</sup> )	Potência radiante (mW)	Irradiância (W/cm <sup>2</sup> )	Exposição radiante - (J/cm <sup>2</sup> )	Energia por ponto (J)	Tempo de irradiação por ponto (s)
SHAM	-	-	-	-	-	-	-
L-Arg	-	-	-	-	-	-	-
PBMT	808 nm	0,028	100	1,7	142	4	40
PBMT+ L-Arg	808 nm	0,028	100	1,7	142	4	40

#### 4.6 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO

O protocolo de exercício foi realizado tomando como base os estudos de Kryściak *et. al.* (74) e RUSS *et al* (75), no qual os 24 animais foram submetidos a um protocolo de exercício dividido em duas etapas: fase de adaptação e fase de treinamento, ambas realizadas na esteira da marca inbramed® Super ATL.

A fase de adaptação dos animais foi composta por 2 semanas prévias com ambientação na esteira e início do treinamento dos animais com exercício 2 vezes por semana, utilizando estímulo no dorso dos animais, rajada leve de vento no dorso e descarga elétrica com intensidade de 2 mA para a realização do exercício.

A fase de treinamento foi composta por 5 dias por semana, por 4 semanas, realizando 30 minutos de atividade física na esteira inbramed® com velocidade 0,277 m/s, percorrendo 500 m por treino.

## 4.7 CONTRAÇÃO TETÂNICA POR ELETROESTIMULAÇÃO

### 4.7.1 PREPARAÇÃO ANIMAL

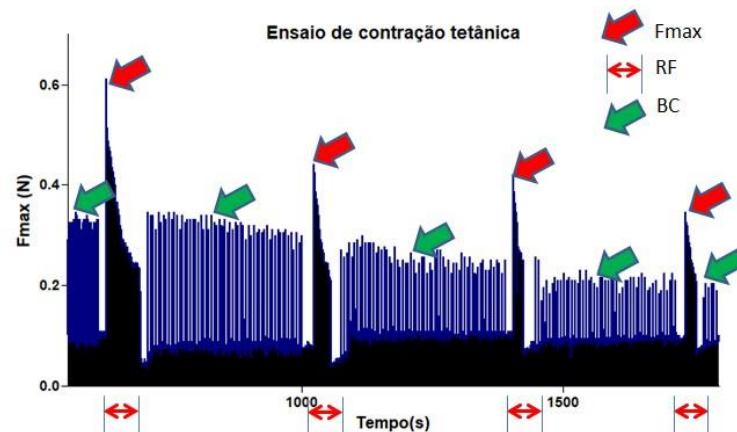
Os animais foram anestesiados intra-peritonealmente com pentobarbital sódico (40 mg/kg) a parte distal do tendão e do músculo tibial anterior foram divulsionados e o nervo ciático exposto. O nervo foi isolado e imediatamente fixado a uma mesa cirúrgica e para dar seguimento ao protocolo de eletroestimulação o nervo foi conectado a um eletrodo bipolar. O músculo e o tendão foram conectados a um transdutor isométrico (Ugo Basile, Varese, Itália), na região da inserção plantar dos metatarsos. O músculo foi submetido a uma tensão constante de 0,1 N, obtida por estimulação com intensidade de estimulação elétrica com frequência de pulso de 0,2 Hz.

### 4.7.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PARA INDUÇÃO DE FADIGA MUSCULAR

A estimulação elétrica do nervo para obtenção dos valores basais foi administrada de acordo com o protocolo estabelecido por Lopes-Martins *et. al.* (69), utilizou-se um eletroestimulador (Ugo Basile, Varese, Italy) com uma intensidade de 6 a 7 V e pulsos com duração de 2 ms. Para indução de fadiga muscular por contração tetânica o nervo foi estimulado gradativamente sendo que a frequência foi aumentada de 0,2 a 60 Hz e mantida até que a força muscular chegasse a 50% de seu valor no início da contração máxima. Este procedimento foi repetido quatro vezes, a cada 5 minutos durante os 20 minutos. A força muscular foi medida por um dinamômetro em Newtons (Ugo Basile Gemini 7070 Physiograph). Para evitar a morte do tecido, durante a estimulação elétrica o músculo foi hidratado por meio de solução salina a 0,9%, apenas até que a tensão da contração muscular diminuísse para 50% sob o registro máximo. Os animais foram eutanasiados administrando-se Pentobarbital sódico com dose de 200mg/kg (DL) por via intraperitoneal associado à lidocaína 10mg/ml (Xylestesin - Cristália). Após a eutanásia o músculo tibial anterior foi dissecado e imediatamente centrifugado (300Xg/10min) e o sobrenadante armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise bioquímicas e de biologia molecular.

### 4.7.3 PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE A CONTRAÇÃO TETÂNICA

Durante todo o período do ensaio experimental de contração tetânica, as informações foram registradas no computador utilizando o programa TESC (Intermetric). Todo o traçado das contrações foi analisado e apresentado em 3 parâmetros experimentais, de acordo com a figura abaixo:



- (1) Amplitude da força máxima registrada durante a contração tetânica ( $F_{max}$  = Newtons).
- (2) Tempo de decaimento da força em 50% do valor máximo durante o estímulo de contração tetânica (Resistência a Fadiga “RF” = segundos).
- (3) Amplitude média da Força de Contração Basal (BC = Newtons).

Todo o protocolo experimental com os tempos de tratamento e os testes utilizados foram apresentados na figura 6.

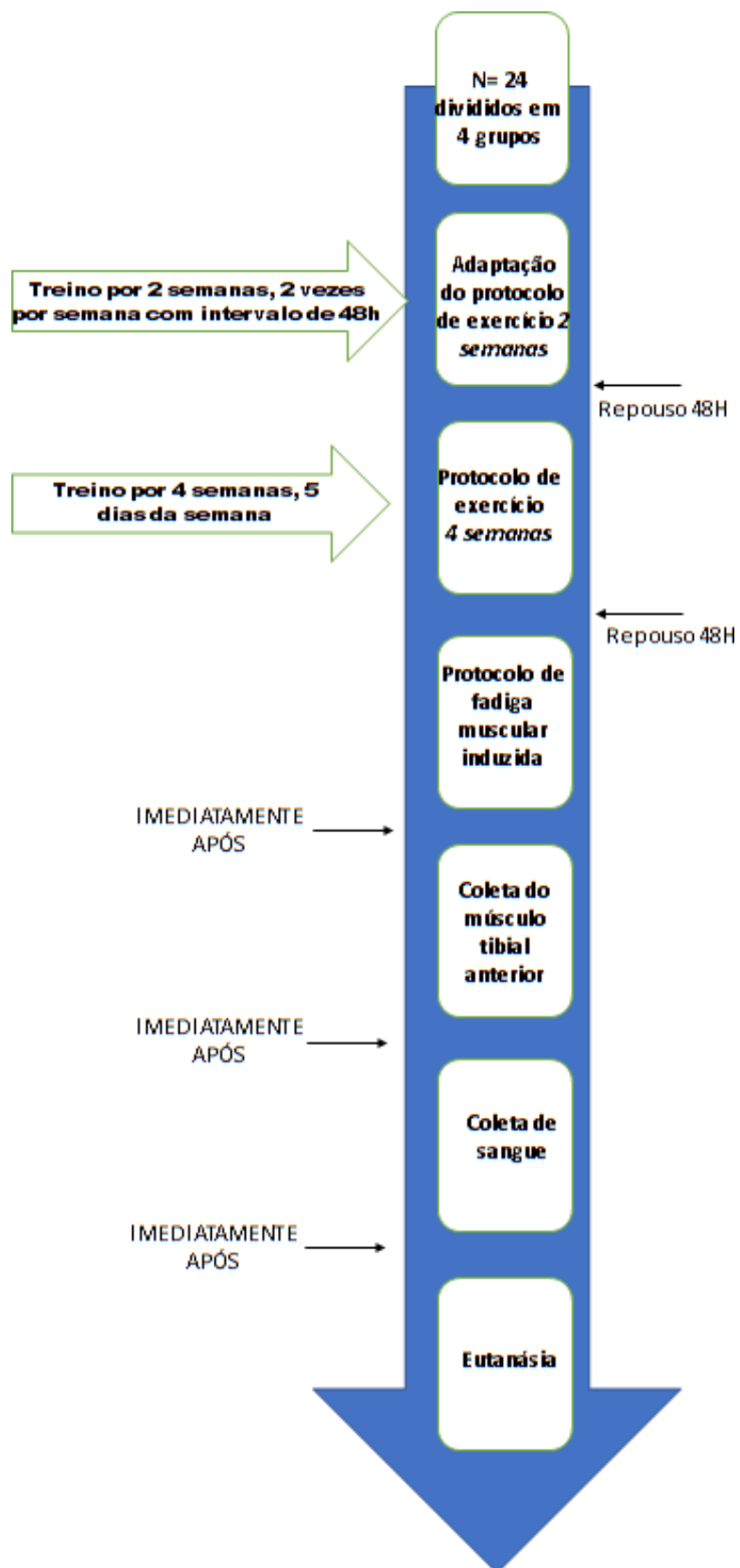


Figura 6: Delineamento e *Timeline* do protocolo experimental

## 4.8- ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 4.8-1. CREATINA QUINASE

Para a análise da creatina quinase foram coletados 3 ml de sangue de cada animal através de punção direta do coração, ação realizada imediatamente após o protocolo de fadiga muscular. O sangue obtido foi centrifugado e separado, e as análises do plasma foram realizadas por um pesquisador cego. A creatina quinase foi analisada pelo uso da técnica imune enzimática conforme instrução do kit (CKnac) Biotécnica® - (Belo Horizonte, MG, Brasil), 1 µL do sangue pipetado foi exposto ao reagente, 0,02 ml da amostra homogeneizada e imediatamente transferida a um recipiente (cubette) a 37 graus Celsius por 2 minutos. A leitura inicial da absorbância foi realizada utilizando uma enzima ligada a um ensaio de imunoabsorção de acordo com as orientações do kit comercial.

### 4.8.2- LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

Para a análise da lactato desidrogenase foram coletados 2 mL de sangue de cada animal através de punção direta do coração, ação realizada imediatamente após o protocolo de fadiga muscular. O sangue foi centrifugado e separado e as análises realizadas a partir do plasma por um pesquisador cego. A lactato desidrogenase foi analisada pelo uso da técnica Biotécnica® (Belo Horizonte, MG, Brasil). 4 µL do soro foi pipetado e exposto a 200 µL do meio de reação em uma placa de 96 poços a 37°C por 3 minutos a 340 nm em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA).

### 4.8.3- MALONDIALDEÍDO (MDA)

A lipoperoxidação foi determinada pela análise dos níveis teciduais de malondialdeído (MDA) com ensaio de TBARS. Para tal, amostras de 50 mg de tibial anterior foram homogeneizadas em 500 µL de tampão de lise SDS (TrisHCl 0,05 M; SDS 0,5%; DTT 1mM; pH 8,0) seguindo a programação de 20

ciclos de 15 segundos, com pausa de 5 segundos entre cada ciclo e a uma velocidade de 4 m/s em homogeneizador Bead Ruptor 12 (OMNI international, EUA). Uma alíquota de 100 µL do homogenato foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm em temperatura de 4°C e 1 µL do sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteína por método de Bradford. Preparou-se mistura contendo 250 µL de homogenato não centrifugado, 50 µL de 4% BHT, 300 µL de ácido acético 20%, pH 3.5, e 300 µL 0.78% de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico. Em seguida, a mistura foi aquecida a 95°C por 60 minutos e centrifugada a 12.000 g por 15 minutos. Então, 100 µL do sobrenadante foi pipetado em duplicata em placa de 96 poços para determinação da absorbância em 532 nm com espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA).

#### 4.8.4- SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Cerca de 50 mg do músculo tibial foi homogeneizado, como já descrito no tópico anterior, em 700 µL de tampão fosfato a 0.1 M (pH 7,4) e, em seguida, centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm e 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para tubo de 1,5 mL e centrifugado por 15 minutos a 12000 rpm e 4°C. Os ensaios da atividade da SOD foram conduzidos em placa de 96 poços aquecida a 25°C. Para tal, cada poço da placa foi preenchido com 25 µL de amostra, 200 µL de meio de reação (0,0015 g de cloreto de tetrazólio azul e 0,0042 g de βNADH em 15 mL de tampão fosfato a 50 mM + EDTA a 0,1 mM) e 25 µL de metossulfato de fenazina (0,0010 g em 50 mL de água deionizada). A seguir, realizou-se 11 leituras (duração total de 5 minutos) em comprimento de onda de 560 nm. As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA).

#### 4.8.5- GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, a atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH



na reação de redução acoplada à reação da GPx. Para tal, cerca de 30 mg de tibial anterior foi homogeneizado, como já descrito no tópico anterior, em 200 µL de tampão Tris-Hcl 50 mM; EDTA 1 mM; pH 7,6, e, em seguida, centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm e 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para tubo de 1,5 mL e centrifugado por 15 minutos a 13200 rpm e 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado na análise da atividade da GPx. A diminuição da absorbância do NADPH a 340 nm foi determinada em espectrofotômetro em placa de 96 poços, contendo 10 µL de homogenato centrifugado, 180 µL de meio de reação (Tris-Hcl 50 mM; EDTA 1 mM; NADPH 0,2 mM; GSH 1 mM; glutationa redutase 0,1 U/mL (G3664 SIGMA); pH 7,6) e 10 µL de Terc-Butil Hidroperóxido (TBOOH) 0,5 mM. A absorbância foi monitorada durante 5 minutos, com intervalo de 30 segundos entre cada leitura. As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA).

#### 4.9- HISTOLOGIA

Para a análise histológica, as amostras do tecido muscular foram coletadas imediatamente após a última contração tetânica muscular induzida eletricamente, fixada a uma solução de formalina a 10% por 72 horas. As amostras foram desidratadas em uma série de banhos alcoólicos iniciando com 50% e progredindo a 100% (SYNTH), clareadas com Xylol por 4 horas (SYNTH) e dispostas em recipientes de alumínio adequados com Paraplast® por 4 horas para impregnação. Na sequência, foram colocadas em pequenos recipientes cobertos com parafina, formando um bloco contendo as amostras do tecido. Cortes medindo 5 µm de espessura foram realizados com microtomo (LEICA RM 2125 RT), lavados e colocados em banhos aquosos. Esses cortes foram expostos e tingidos com hematoxilina e eosina, acomodados e organizados em placas para subsequente análise por microscopia ótica (Nikon®, Eclipse E-200 model, China). Os espécimes foram fotografadas usando uma câmera microfotográfica (Dino-Lite Digital Microscope®, DinoEye AM423X model, Brasil), conectada a um microcomputador. As fotos de todos os grupos foram padronizadas em magnificação de x100 e avaliadas por um pesquisador cego que utilizou cinco critérios patológicos: desorganização das

fibras musculares (A); núcleo celular distribuído de forma heterogênea (B); núcleo celular deslocado para o centro das fibras musculares (C); aglomeração do núcleo celular no centro da fibra muscular (D); infiltrado com células inflamatórias e hemorragia (F).

#### 4.10- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados em Software Microsoft Excel 2017 e inicialmente avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, concluindo como resultado a distribuição normal. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way, com “*post hoc test*” de Bonferroni. Utilizando Software GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). Adotando um nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1- CREATINA QUINASE (CK)

Os dados apresentados demonstram a comparação entre os grupos Sham, PBMT, L-Arginina e PBMT associada a L-Arginina após um período de treinamento aeróbico em esteira de 4 semanas e estimulação elétrica em tetania do músculo tibial anterior. Observa-se os resultados do grupo Sham ( $145,0 \pm 12,10$  ul); grupo PBMT ( $75,28 \pm 8,9$  ul) no grupo L-Arg ( $102,0 \pm 12,0$  ul) e o grupo PBMT + L-Arg ( $80,38 \pm 10,23$  ul). Na comparação estatística houve diferença significativa entre o grupo Sham e todos os outros grupos experimentais ( $p \leq 0,001$ ). Já para a análise entre os grupos PBMT e grupo L-Arginina foi observada diferença estatística com valor de ( $p \leq 0,01$ ), e com o grupo de associação de terapias (PBMT + L-Arginina) não houve diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ). Também foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos L-Arginina e PBMT + L-Arginina ( $p \leq 0,05$ ) nos níveis de CK coletados. (Figura 7). Tais resultados indicam níveis mais elevados de CK no grupo Sham que não recebeu a PBMT nem suplementação com L-Arginina.

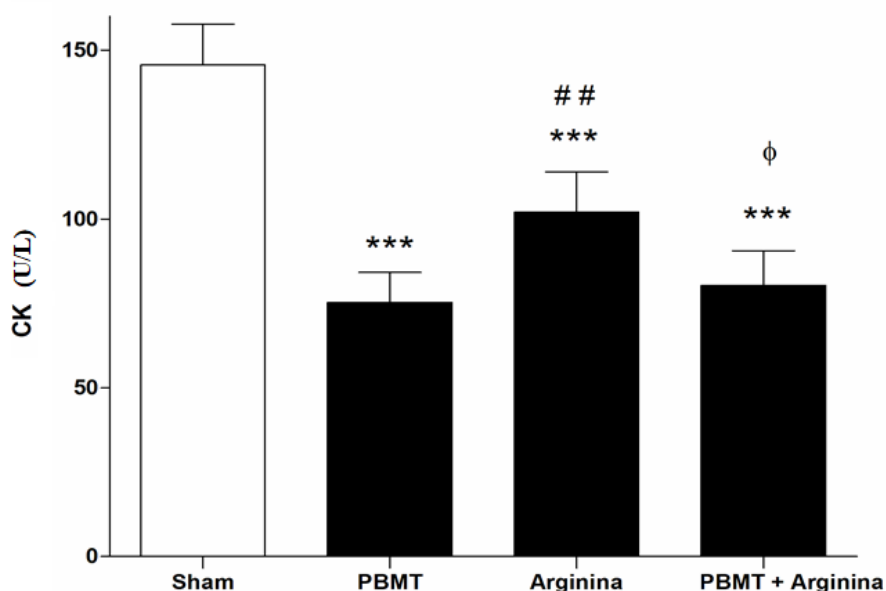


Figura 7. Concentração dos níveis de Creatina Kinase (CK) no plasma de ratos submetidos a treinamento aeróbico e posterior protocolo de fadiga por eletroestimulação. \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ) e \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ), VS grupo Sham; ## ( $p \leq 0,01$ ), VS grupo PBMT e  $\phi$  ( $p \leq 0,05$ ) VS grupo L-Arginina.

## 5.2 LACTATO DESIDROGENASE – (LDH)

Para a análise do LDH foi realizada uma comparação entre os grupos Sham, PBMT, L-Arginina e PBMT associado a L-Arginina após um período de treinamento aeróbico em esteira de 4 semanas e estimulação elétrica em tetania do músculo tibial anterior. Observa-se os resultados dos níveis de LDH do grupo Sham ( $110,80 \pm 11,43$  ul); grupo PBMT ( $91,03 \pm 10,59$  ul) ; grupo L-Arginina ( $115,6 \pm 8,6$  ul) e o grupo PBMT associado a L-Arginina ( $114,6 \pm 11,11$ ul). Na comparação entre os grupos usando o post hoc de Bonferroni após o ANOVA apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo Sham com o grupo PBMT ( $p \leq 0,01$ ), na comparação do Sham cm o grupo L-Arginina e PBMT + L-Arginina não houve diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ). Para a comparação entre os grupos PBMT e o grupo L-Arginina foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ) e com o grupo PBMT associado a L-Arginina a diferença apontada foi de ( $p \leq 0,05$ ). Já na comparação entre os grupos L-Arginina e PBMT associado a L-Arginina não houve diferença estatística significativa ( $p \geq 0,05$ ), nos níveis de LDH coletados. (Figura 8).

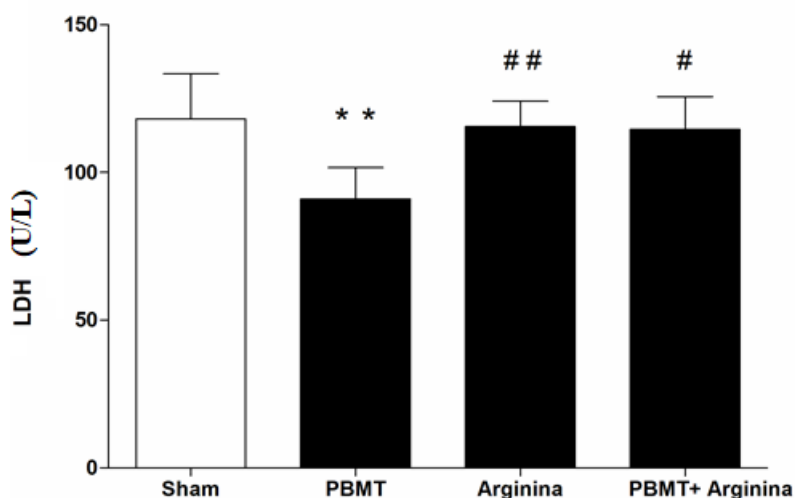


Figura 8. Concentração dos níveis de LDH no plasma de ratos submetidos a treinamento aeróbico em esteira e posterior protocolo de fadiga do músculo tibial anterior por eletroestimulação. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*\*  $p \leq 0,01$  VS Sham; ##  $p \leq 0,01$  VS grupo PBMT.

### 5.3. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR MALONDIALDEIDO (MDA)

As Concentrações médias de MDA entre os grupos, após o protocolo de fadiga muscular induzida foram as seguintes descritas: observa-se os resultados do grupo Sham ( $100,0\% \pm 21,06$ ); grupo PBMT ( $72,87\% \pm 6,37$ ); grupo L-Arginina ( $91,07\% \pm 13,76$ ) e grupo PBMT associado a L-Arginina ( $136,1\% \pm 22,46$ ). Na análise estatística observa-se diferença estatística significativa entre os grupos Sham e PBMT associado a L-Arginina sendo ( $p \leq 0,01$ ), na comparação do Sham e demais grupos não houve diferença estatística. ( $p \geq 0,05$ ); Foi observado também diferença significativa entre os grupos PBMT e PBMT associado a L-Arginina ( $p \leq 0,001$ ) e entre os grupos L-Arginina, versus PBMT associado a L-Arginina foi constatado diferença de ( $p \leq 0,01$ ), não foi observado diferença significativa na comparação entre os demais grupos ( $p \geq 0,05$ ). Estes resultados denotam um aumento da peroxidação lipídica no grupo onde a PBMT foi aplicada em associação a L-Arginina. ( Figura 9).

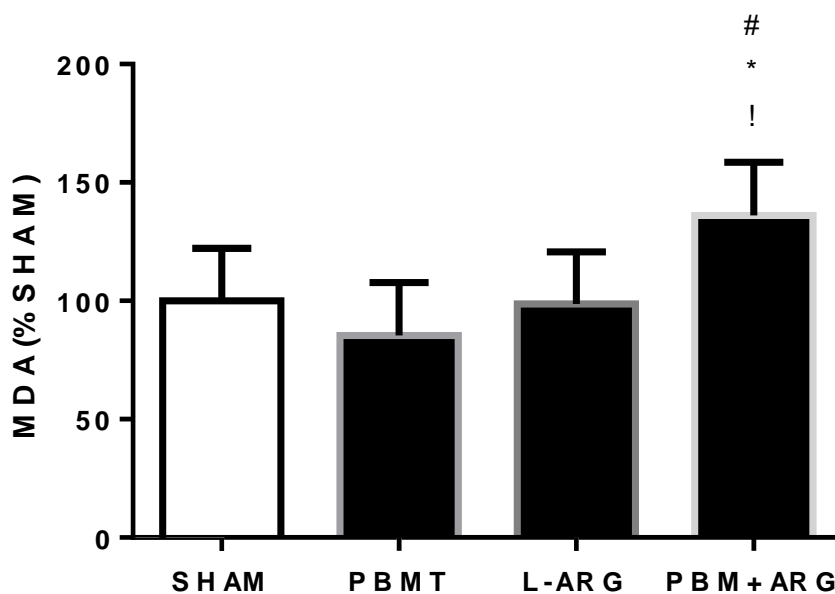


Figura 9. Níveis de peroxidação lipídica por MDA (%SHAM) após o protocolo de fadiga muscular por eletroestimulação. \*  $p \leq 0,05$  VS grupo Sham; #  $p \leq 0,05$  VS grupo PBMT; !  $p \leq 0,05$  VS L-Arginina.

#### 5.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR MEIO DOS NÍVEIS DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Em relação ao SOD observa-se os resultados do grupo Sham ( $100,0\% \pm 10,94$ ); grupo PBMT ( $93,96\% \pm 6,49$ ); grupo L-Arginina ( $77,36\% \pm 6,53$ ) e grupo PBMT associado a L-Arginina ( $80,20\% \pm 5,9$ ), Na análise estatística houve diferença significativa entre os grupos Sham versus grupo L-Arginina e grupo PBMT associado a L-Arginina sendo ( $p \leq 0,01$ ); não havendo diferenças significativas entre os grupos Sham e grupo PBMT ( $p \geq 0,05$ ); Nas demais comparações também não foi observada diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ); tais achados demonstram o aumento da capacidade antioxidante causada pela PBMT aumenta os níveis de SOD (Figura 10).

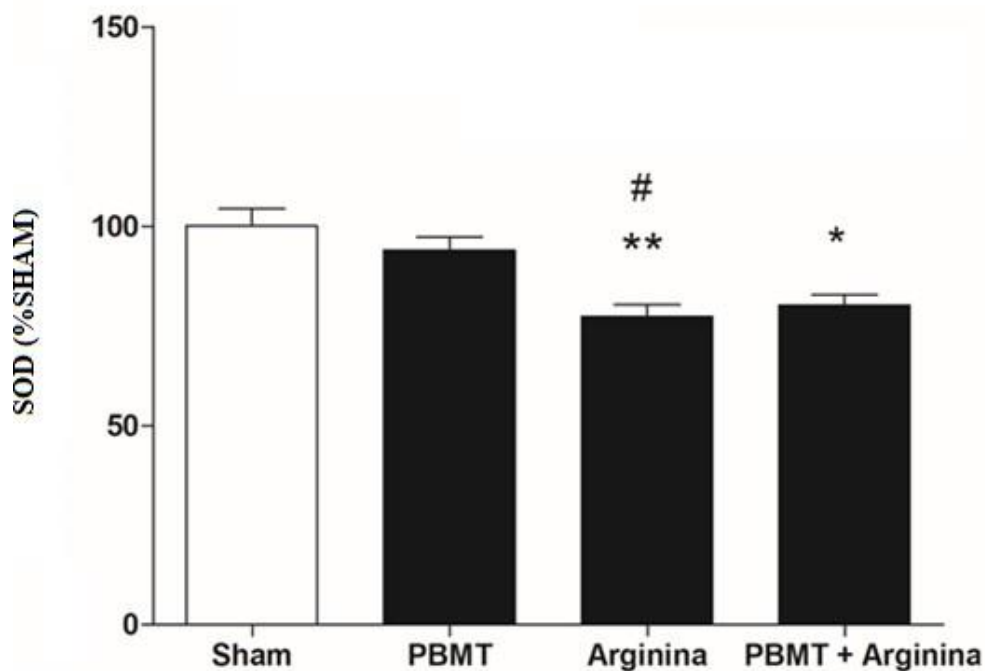


Figura 10. Comparação da concentração de SOD no músculo tibial anterior de ratos submetidos a treinamento aeróbico em esteira e posterior protocolo de fadiga muscular por eletroestimulação. A figura representa a concentração da SOD após o protocolo de fadiga muscular por eletroestimulação. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$  VS grupo Sham; #  $p \leq 0,05$  VS grupo PBMT.

## 5.5. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

Em relação à intervenção pós fadiga do tibial anterior, para análise da atividade antioxidante usando a GPx observa-se os resultados do grupo Sham com média e desvio padrão de (100,0% ± 7,74); grupo PBMT (87,15% ± 26,68), grupo L-Arginina (54,85% ± 20,14) e finalmente o grupo PBMT + L-Arginina (111,75% ± 40,9). Na comparação entre os grupos observa-se diferença significativa entre os grupos Sham e grupo L-Arginina sendo ( $p \leq 0,05$ ) e entre os grupos L-Arginina e PBMT + L-Arginina ( $p \leq 0,05$ ) para as demais comparações entre os grupos não foi observada diferença estatística ( $p \geq 0,01$ ). Os resultados para GPx demonstram o aumento dos níveis desta substância antioxidante quando submetida a PBMT e associação entre PBMT+L-Arginina (Figura 11).

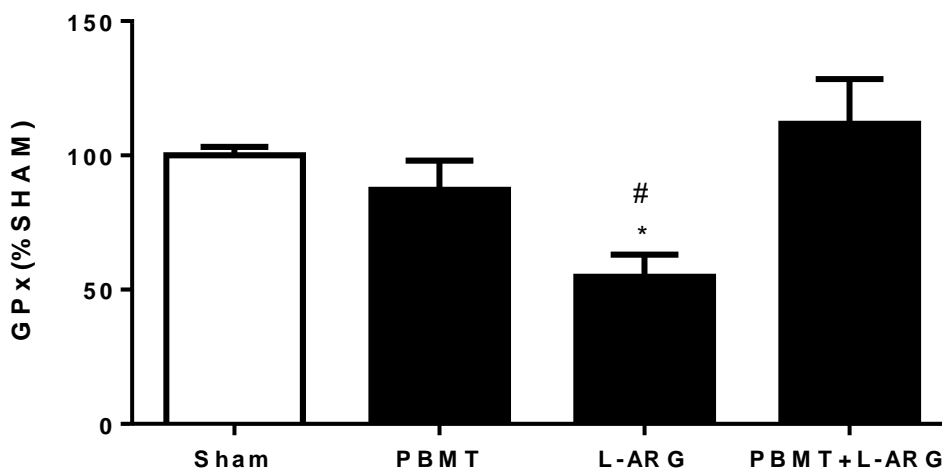


Figura 11. Comparação da concentração de GPx no músculo tibial anterior de ratos submetidos a treinamento aeróbico em esteira e posterior protocolo de fadiga muscular por eletroestimulação. A figura representa a concentração da GPx após o protocolo de fadiga muscular por eletroestimulação. \*  $p \leq 0,05$  VS grupo Sham; #  $p \leq 0,05$  VS grupo PBMT+L-ARG.

## 5.6. AMPLITUDE DA FORÇA DE CONTRAÇÃO NA CONTRAÇÃO

### TETÂNICA

Com a realização do protocolo de fadiga muscular eletricamente induzida foi possível analisar pico de força e tempo de sustentação da contração muscular de cada grupo, o grupo SHAM – submetido ao protocolo de exercício sem tratamento ou suplementação demonstrou um pico de força máxima de  $0,69 \pm 0,2$  (N) e tempo de sustentação de  $8 \pm 0,5$  segundos. O grupo PBMT, submetido a PBMT antes do protocolo de exercício demonstrou um pico de força máxima de  $0,7 \pm 10$  (N) e tempo de sustentação de  $18 \pm 10$  segundos. O grupo L-Arginina, submetido a suplementação com L-Arginina antes do protocolo de exercício demonstrou um pico de força máxima de  $0,63 \pm 0,5$  (N) e tempo de sustentação de  $23 \pm 5$  segundos. E, por fim, o grupo de associação da L-Arginina e PBMT antes do protocolo de exercício demonstrou um pico de força máxima de  $0,84 \pm 0,5$  (N) e tempo de sustentação de  $20 \pm 0,5$  segundos. Ao serem submetidos a análise estatística por variância ANOVA One Way e post hoc test de Turkey na comparação com o grupo Sham

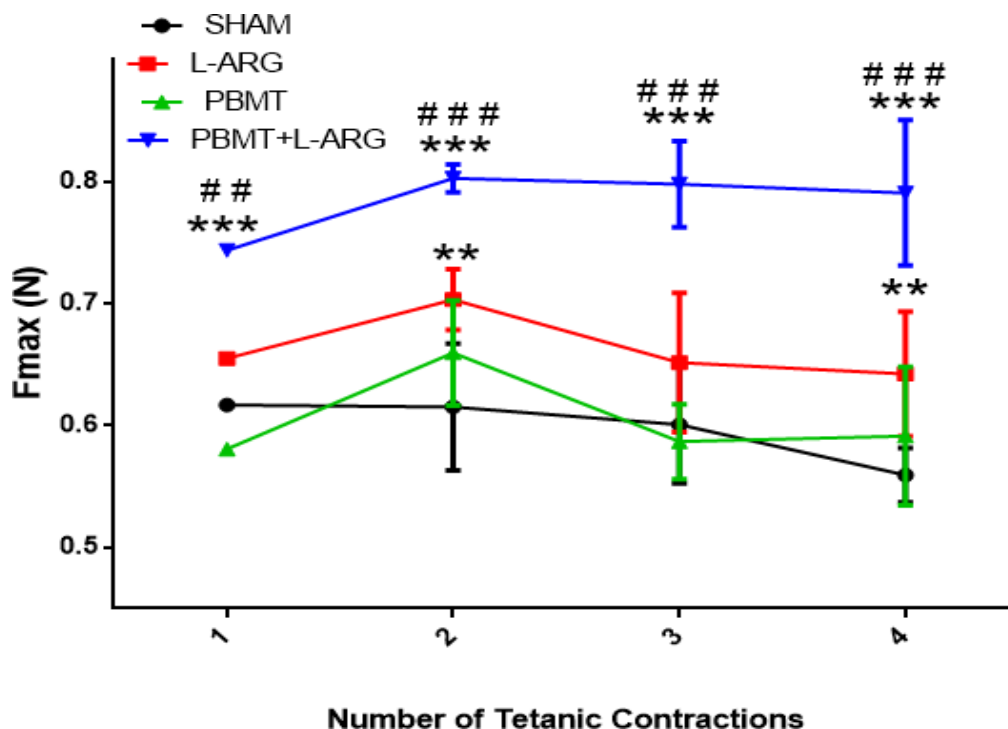


Figura 12: Gráfico da avaliação da força máxima em cada contração tetânica comparando os grupos Sham (preto), L-Arginina (vermelho), PBMT (verde) e associação entre PBMT e L-Arginina (em azul). \*  $p < 0,05$  VS SHAM; #  $p < 0,05$  VS L-ARG. Teste Anova two way.



## 5.7 TEMPO DE DECAIMENTO DA FORÇA EM 50% DA FORÇA

### MÁXIMA DURANTE A CONTRAÇÃO TETÂNICA

Neste gráfico foi feita uma análise através do cálculo da área do pico sobre a curva das quatro tetanias realizadas no protocolo de fadiga, os picos de força e sua queda até 50% do valor máximo foram isoladas e analisadas, demonstrando que os animais submetidos ao tratamento pré exercício com PBMT apresentaram picos de força mais altos, seguidos pelo grupo intervenção com L-Arginina.

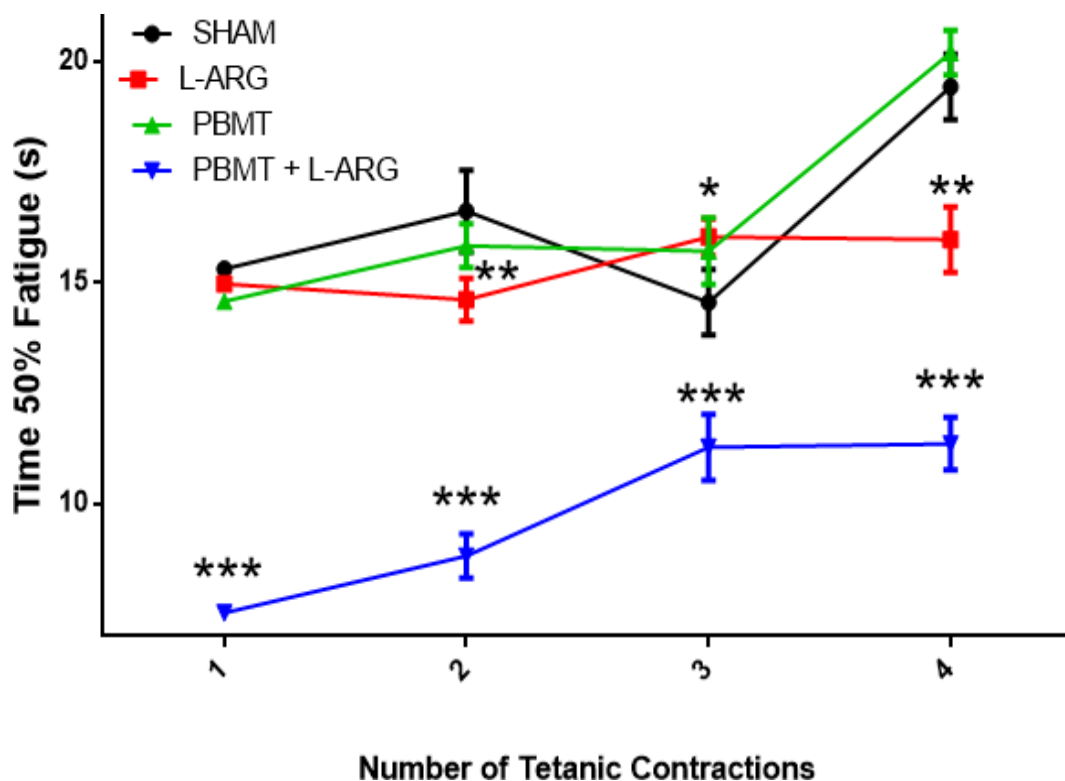


Figura 13: Gráfico da avaliação do tempo em segundos da força decair em 50% do valor máximo, comparando os grupos Sham (preto), L-Arginina (vermelho), PBMT (verde) e associação entre PBMT e L-Arginina (azul). Este gráfico demonstra o tempo de sustentação da força máxima até seu decaimento em 50% do seu valor, representando a resistência muscular. \*  $p < 0,05$  VS SHAM. Teste Anova two way.

## 5.8. AMPLITUDE DA CONTRAÇÃO BASAL

Neste gráfico foi feita uma avaliação da força de contração basal mantida entre as contrações tetânicas comparando os grupos Sham (SHAM – em preto), L-Arginina (L-ARG - em vermelho), PBMT (PBMT– em verde) e associação entre PBMT e L-Arginina (PBMT + L-ARG – em azul). Este gráfico demonstra que a força de contração basal manteve-se no grupo L-Arginina mais elevada que nos demais, não havendo decaimento da sua força entre as tetanias, seguido do grupo associação entre PBMT e L-Arginina, que se eleva após a primeira tetania e após mantém-se próxima da força do grupo L-Arginina e do grupo PBMT, sendo a força de contração basal menor no grupo SHAM. A análise estatística foi feita com aplicação do teste *Anova two way*.

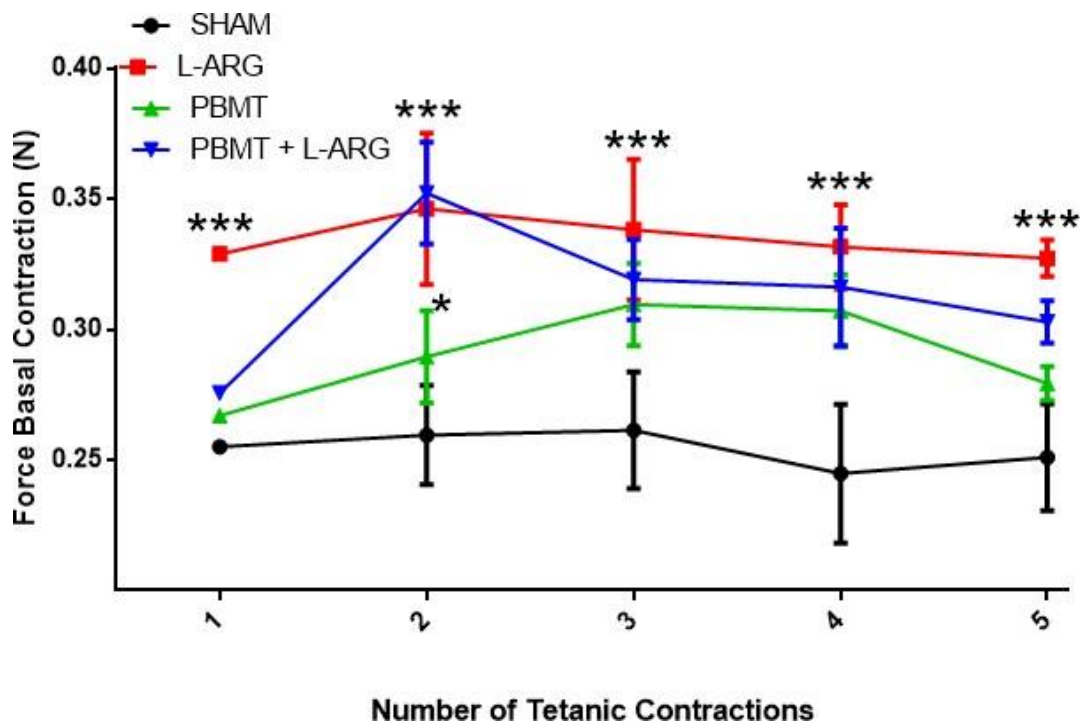


Figura 14: Gráfico da avaliação da força de contração basal mantida entre as contrações tetânicas comparando os grupos Sham (preto), L-Arginina (vermelho), PBMT (verde) e associação entre PBMT e L-Arginina (azul). Este gráfico demonstra que a força de contração basal manteve-se no grupo L-Arginina mais elevada que nos demais, não havendo decaimento da sua força entre as tetanias, seguido do grupo associação entre PBMT e L-Arginina, que se eleva após a primeira tetania e após mantém-se próxima da força do grupo L-Arginina e do grupo PBMT, sendo a força de contração basal menor no grupo SHAM. \*  $p < 0,05$  VS SHAM. Teste *Anova two way*.

### 5.9. FIGURA REPRESENTATIVA DO ENSAIO DE CONTRAÇÃO TETÂNICA PARA CADA GRUPO EXPERIMENTAL

Nesta figura demonstra-se o protocolo de fadiga muscular induzida eletricamente, cada figura é representativa do seu grupo SHAM, L-Arginina, PBMT e associação entre PBMT e L-Arginina, apresentando as quatro tetanias de cada animal (4 picos) e a contração basal apresentada entre os picos de força (N).

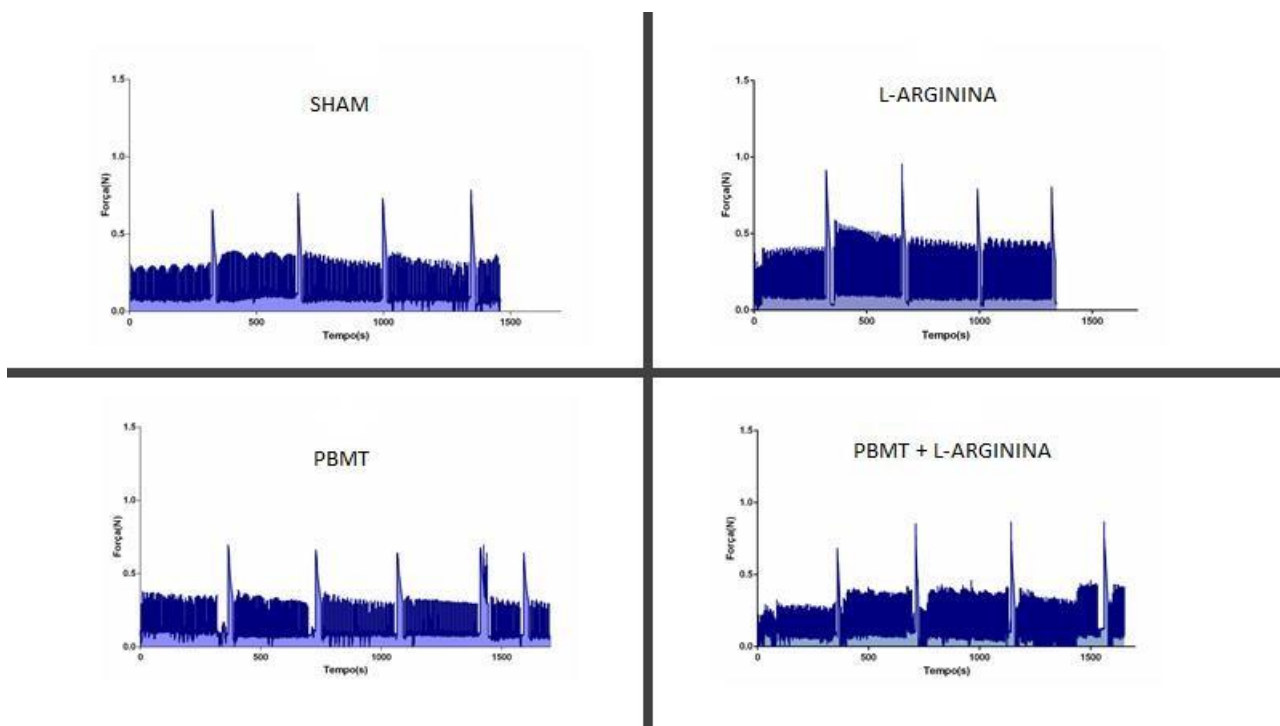


Figura 15: Representativas do protocolo de fadiga muscular induzida eletricamente, sendo produzidas quatro curvas correspondentes as tetanias.

## 5.10- ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Em estudo histológico do tecido muscular do tibial anterior pudemos perceber que não houve atrofia ou hipertrofia do músculo avaliado em nenhum animal, todos os tecidos apresentaram marcadores de inflamação discreta, ocasionais mastócitos perivasculars foram encontrados em todas as amostras, sendo que em alguns animais do grupo SHAM pôde-se notar sua presença em tecidos mole adjacentes e poucos neutrófilos intravasculares em diapedese, focal, já nos animais do grupo de intervenção com PBMT foram encontrados ocasionais mastócitos perivasculars, neutrófilos intravasculares, focal e em alguns animais neutrófilos intravasculares e em diapedese, multifocal; nos animais do grupo L-Arginina foram identificados ocasionais mastócitos perivasculars e intersticiais e em sua maioria neutrófilos intravasculares e perivascular discreto, multifocal, e por último, no grupo de associação de L-Arginina e PBMT pôde-se apontar a presença de ocasionais mastócitos perivasculars e intersticiais, em alguns animais com neutrófilos intravasculares e em diapedese, focal ou neutrófilos intravasculares e perivascular discreto, focal.

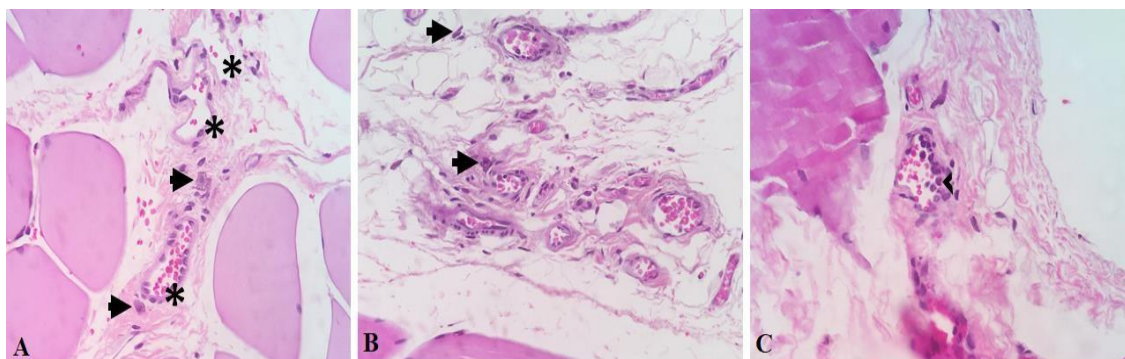


Figura 16: Grupo SHAM, figuras representativas demonstrando achados histológicos: (A) Tecido muscular em corte transversal exibindo vasos (asterisco) no centro da imagem e mastócitos perivasculars (seta preta). (H&E, 400x) ; (B) Tecido adiposo exibindo mastócitos perivasculars e intersticiais (seta preta) . Tecido muscular na porção inferior da imagem (H&E, 400x); (C) Vasos sanguíneos com neutrófilos intravasculares e em diapedese (cabeça da seta) (H&E, 400x). H&E=Hematoxilina e eosina.

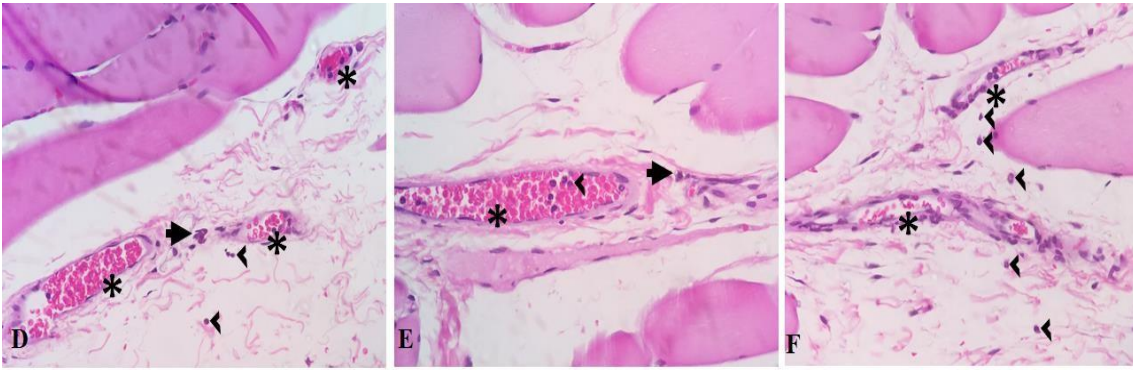


Figura 17: Grupo PBMT, figuras representativas demonstrando achados histológicos: (D) Tecido muscular em corte longitudinal exibindo vasos (asterisco), mastócitos (seta preta) e neutrófilos (cabeça da seta) perivasculares (H&E, 400x); (E) Tecido muscular em corte transversal exibindo vaso sanguíneo (asterisco) no centro da imagem com neutrófilos intravasculares (cabeça da seta) e mastócito perivascular (seta preta), (H&E, 400x) ; (F) Vasos sanguíneos (asterisco) e neutrófilos perivasculares (cabeça da seta) (H&E, 400x). H&E=Hematoxilina e eosina.

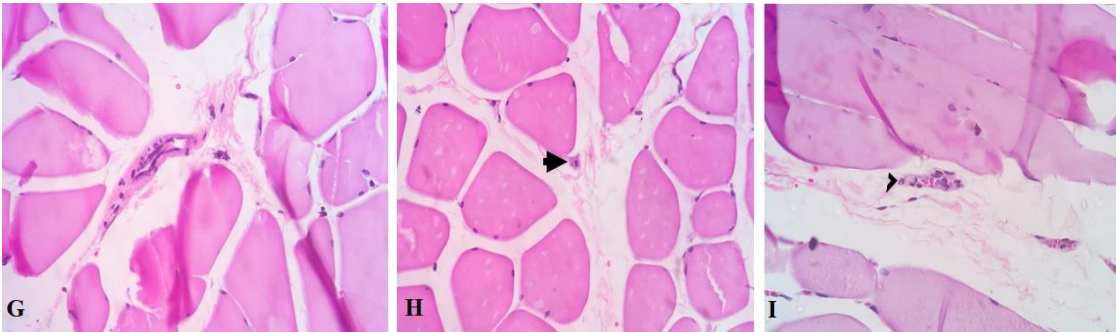


Figura 18: Grupo L- L-Arginina, figuras representativas demonstrando achados histológicos: (G) Tecido muscular em corte transversal exibindo vaso sanguíneo (asterisco) e mastócito perivascular (seta preta). (H&E, 400x) ; (H) Tecido muscular em corte transversal mastócito intersticial (seta preta). (H&E, 400x); (I) Tecido muscular em corte longitudinal exibindo vaso sanguíneo no centro da imagem com neutrófilos perivasculares (cabeça da seta) (H&E, 400x). H&E=Hematoxilina e eosina.



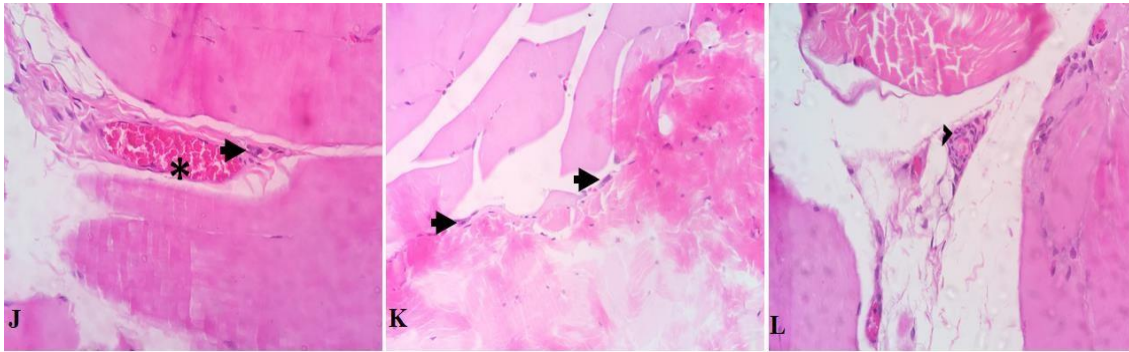


Figura 19: Grupo associação PBMT e L-Arginina, figuras representativas demonstrando achados histológicos: (J) Tecido muscular em corte longitudinal exibindo vaso sanguíneo (asterisco) e mastócito perivascular (seta preta); (K) Mastócitos intersticiais (seta preta). Tecido muscular na parte superior da imagem e tendão inferiormente. (H&E, 400x); (L) Vaso sanguíneo no centro da imagem com neutrófilos em diapedese (cabeça da seta). (H&E, 400x). H&E=Hematoxilina e eosina.

## 6. DISCUSSÃO

Os efeitos da aplicação da PBMT sobre o estresse oxidativo e na lesão muscular decorrente da prática de exercício físico têm sido estudados, avaliando seus efeitos em diversos aspectos (2, 61, 76).

Ainda há muita divergência sobre os parâmetros a serem utilizados (11, 12, 62, 77, 78), o momento de aplicação da PBMT – se antes ou após a realização de exercício (11, 79), assim como o tipo de exercício, se resistido ou aeróbico (61,76, 80), a associação e comparação da PBMT com outras terapias, como a crioterapia, a massagem, o alongamento e a suplementação com diversos componentes, dentre os quais a L-Arginina (70, 81, 82, 75, 83).

Portanto, apesar dos resultados promissores da aplicação de PBMT na fadiga muscular há muitas relações a serem investigadas e discutidas. Este estudo teve como eixo principal a análise da fadiga muscular avaliando o músculo tibial anterior de ratos submetidos a exercício aeróbico através de treinamento em esteira ergométrica, sendo que a fadiga muscular foi induzida indiretamente a partir da estimulação do nervo ciático, comparando os efeitos do exercício aeróbico isolado ou associado à suplementação com L-Arginina e PBMT.

Nossos resultados indicaram que o uso de PBMT associado à L-Arginina melhorou a amplitude da força de contração (Fmax) e a recuperação muscular (BC) após as contrações tetânicas induzidas, além de preservar o tecido muscular indicado pelos resultados histológicos normais e pela redução dos níveis de CK.

Contudo, a resistência a fadiga (RF) foi reduzida neste grupo (PBMT + L-Arg) seguido da redução na concentração de SOD e do aumento dos níveis de MDA.

O Grupo L-Arg também apresentou aumento da Fmax e diminuição da RF na última contração tetânica e similarmente aos grupos tratados, apresentou melhora na recuperação muscular, indicada pelo aumento da força de contração basal (BC) registrada após cada tetania e apesar do grupo L-Arg apresentar redução dos níveis de CK, os marcadores antioxidantes (SOD e GPx) foram reduzidos.

O grupo PBMT apresentou Fmax e RF similar ao grupo só com exercício (SHAM) e registrou melhora na BC, além de reduzir os níveis de CK e LDH, mantendo a concentração de SOD e GPx similar ao grupo SHAM.

Na análise dos resultados funcionais foi observado que o aumento de Fmax aconteceu nos grupos L-Arg e PBMT + L-Arg, indicando que tanto o uso da L-Arginina, quanto sua associação com PBMT, facilitaria o aumento da amplitude da força de contração muscular durante o ensaio de contração tetânica.

Em estudo anterior, Lopes-Martins já havia demonstrado a melhora da atividade muscular em animais (69), após a suplementação com L-Arginina ou com a PBMT em diferentes parâmetros de energia (2, 15, 69, 74, 82), porém, não foi realizado o estudo destes 2 tratamentos associados. Esses resultados condizem com estudos que apontam que a suplementação com L-Arginina pode melhorar o rendimento muscular (15,40,48,70).

Outro fator avaliado foi a resistência a fadiga, representada pelo decaimento da força de contração até atingir 50% da amplitude máxima (RF). Neste trabalho, enquanto o grupo PBMT manteve RF similar ao grupo SHAM, os grupos L-Arg e PBMT + L-Arg apresentaram redução na resistência a fadiga (RF).

Estes resultados podem ser justificados pela intensidade de Fmax nestes 2 grupos (L-Arg e PBMT + L-Arg), que poderia dificultar a manutenção da amplitude e reduzir a resistência a fadiga.

Alguns estudos demonstraram que o exercício físico exaustivo aumenta a produção das EROs e, conseqüentemente provoca estresse oxidativo (8, 37, 85), o que justificaria a relação entre a redução da RF e o aumento de MDA e redução da SOD nos grupos envolvendo a suplementação com L-Arginina.

O exercício crônico moderado produz adaptações metabólicas que podem ajudar a reduzir o estresse oxidativo, desta forma destacamos a importância da frequência da realização do exercício, justificado pelo modelo experimental aeróbico utilizado neste estudo.

As adaptações fisiológicas decorrentes da prática de treinamento físico e as respostas bioquímicas sobre os marcadores de estresse oxidativo ainda não são claras (85).

Outro fator avaliado foi a recuperação muscular após as contrações tetânicas, indicada pela amplitude da contração basal. O grupo L-Arginina obteve melhor resultado demonstrando estar diretamente ligado a resistência muscular pois



além de ter força mais elevada também se manteve quase que constante entre a ocorrência das 4 contrações tetânicas.

Este fato pode ser atribuído a melhora das propriedades vasodilatadoras do endotélio causada pela associação entre o exercício aeróbico regular e a suplementação com a L-Arginina (103).

Também foram demonstrados resultados de que a suplementação oral de L-arginina é capaz de aumentar a resistência muscular à fadiga, efeito supostamente atribuído a melhora da circulação local nos membros envolvidos no esforço físico realizado (15, 82).

Os grupos de associação PBMT e L-Arginina e o grupo PBMT obtiveram melhores resultados comparados ao grupo que apenas realizou exercício aeróbico, o que nos faz questionar o tempo do efeito sistêmico da aplicação da PBMT em tecido muscular, pois a PBMT não foi aplicada imediatamente antes do protocolo de fadiga muscular e sim dias antes da ocorrência das contrações tetânicas, demonstrando que houve efeito benéfico tanto da L-Arginina como da PBMT e sua associação no rendimento muscular (69, 104).

No entanto, é importante comparar os resultados funcionais com análises bioquímicas relacionadas tanto à lesão muscular (CK) e a formação de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo. Com relação a ocorrência da fadiga muscular, alguns biomarcadores são mais citados por estarem ligados ao estresse oxidativo e a ocorrência do dano muscular. Dentre estes citamos a CK e a LDH, que são enzimas ligadas a fonte de energia utilizada pelo tecido na realização da contração muscular (11).

Neste trabalho, foi observado que todos os grupos tratados com PBMT ou L-Arg apresentaram redução dos níveis de CK, por outro lado apenas o grupo PBMT reduziu os níveis de LDH abaixo do grupo SHAM.

Níveis elevados de CK são indicadores de lesão na membrana da célula muscular onde enzimas são carregadas pela corrente sanguínea, portanto estão diretamente ligadas a ocorrência da lesão muscular (11, 34).

Ademais, um estudo clínico duplo-cego e randomizado de Leal Junior *et. al.*(2), investigando lesão muscular após prática de exercício aeróbico e uso da PBMT apurou os níveis de CK e apontaram que a PBMT pré-exercício promoveu níveis inferiores de CK, demonstrando menor ocorrência de lesão muscular comparado ao grupo que recebeu tratamento placebo.

O benefício da aplicação da PBMT na prevenção de lesão muscular e retardo da fadiga em atletas foi demonstrado portanto por Leal-Junior *et al*, que utilizou PBMT em 2 diferentes comprimentos de onda (655nm e 830nm) em atletas durante exercício aeróbico, observando uma redução da fadiga muscular, e seus resultados corroboram com o do presente estudo (2, 78).

Em estudo experimental realizado por Vieira *et.al.*(105 NUMERO) foi investigada a atividade e padrão eletroforético da LDH em resposta ao exercício em esteira em ratos submetidos à PBMT e constatou reduções na atividade da LDH causadas pelo laser, pelo exercício aeróbico e também pelas ações combinadas.

Com relação a redução de LDH no grupo PBMT, alguns estudos clínicos também encontraram esta evidência. Leal Junior *et. al.* (2), em estudo comparando os efeitos de um único diodo de laser de baixa intensidade com um cluster de LEDT antes da prática de exercício de alta intensidade, notou que houve níveis reduzidos de CK após o exercício apenas quando indivíduos foram irradiados pré-exercício com LEDT, mas sem alterações nos níveis de lactato sanguíneo ou desempenho em ambos os grupos.

Os resultados não significativos podem ser explicados pela área do músculo reto femoral que fora irradiada e vários grandes grupos musculares envolvidos em um teste Wingate.

O estresse oxidativo tem importante participação na recuperação muscular e na reposta adaptativa ao exercício, porém, em níveis desmedidos, ele pode resultar em diminuição do desempenho físico e comprometimento da recuperação muscular, afetando negativamente as sessões de treinamento subsequentes e a adaptação fisiológica ao exercício (2).

Fundamentou-se o uso de substâncias antioxidantes na tentativa de contrapor o estresse oxidativo induzido pelo exercício, assim o consumo de antioxidantes e suplementação tem desbravado cada vez mais adeptos(84).

Dentre os componentes consumidos com este propósito está o aminoácido L-Arginina, que emergiu como opção terapêutica com resultados positivos principalmente ligados ao retardo da fadiga muscular e melhora no desempenho físico, porém a literatura não é concordante a respeito dos benefícios advindos da suplementação antioxidante, inclusive com indícios que

essa estratégia pode inibir a adaptação muscular fisiológica ao exercício (2, 84, 70).

Outro resultado apresentado neste estudo foi sobre a peroxidação lipídica determinada pela concentração de MDA. Foi observado que o grupo PBMT + L-Arg apresentou aumento dos níveis de MDA quando comparado aos demais grupos.

O MDA é um biomarcador largamente utilizado ao estudar a fadiga muscular e o estresse oxidativo, sua presença causa oxidação de proteínas que, ao acumular, resulta em desestabilização da membrana lisossômica, liberação de proteases, maior permeabilidade da membrana mitocondrial e apoptose (93).

Como podemos observar na Figura 9 não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de MDA entre os grupos SHAM, PBMT e L-Arginina, podendo então concluir que tanto a suplementação com a L-Arginina como a PBMT, apesar deste último grupo ter apresentado valores inferiores de MDA comparado ao SHAM, não preveniram a lipoperoxidação.

Podemos sugerir que a dose utilizada de L-Arginina foi inferior a apontada por estudos recentes que tem maior ação no estresse oxidativo, assim como há evidências contrárias sobre o momento de aplicação da PBMT, sendo apontado por alguns estudos que, se aplicado após a realização do exercício obtém-se melhores resultados no que diz respeito a peroxidação lipídica (7, 15, 48, 70, 81, 82).

A elevação dos valores de MDA no grupo PBMT associado a L-Arginina é um resultado intrigante, haja vista que a associação dos dois não havia sido estudada antes em exercício aeróbico, nos fazendo questionar quais as possíveis causas do aumento do MDA neste grupo, algo a ser investigado em estudos futuros.

Com relação a influência da L-Arginina em células musculares, um estudo realizado por K Ranjbar *et. al.* (15), que investigou os efeitos do exercício aeróbico e da suplementação com a L-Arginina em ratos após infarto do miocárdio, demonstrando que o exercício aeróbico, a suplementação com a L-Arginina e sua associação têm efeito benéfico na redução do estresse oxidativo.

Ranjbar *et.al.* (15) apontou também que os grupos que realizaram exercício aeróbico e o grupo que recebeu suplementação com L-Arginina sem realização

de exercício não apresentaram redução do MDA, já a sua associação reduziu o MDA em ratos após infarto, demonstrando que com treinamento aeróbico e suplementação com a L-arginina houve redução de lesões renais e hepáticas em ratos através da redução do estresse oxidativo.

No entanto, a presença de moléculas que modulam o estresse oxidativo nem sempre são negativas. Na homeostasia existe um equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs, essenciais para respostas homeostáticas do organismo tais como a ativação de mecanismos antioxidantes, a produção de força muscular, o controle de vias de sinalização e a regulação da expressão gênica, sendo que a produção elevada de EROs resulta em dano oxidativo em diferentes células e tecidos, o que converge em morte celular (94).

Com relação a moléculas antioxidantes, podemos falar das enzimas GPX e SOD. Neste trabalho, ambos os grupos L-Arg e PBMT + L-Arg apresentaram redução da concentração de SOD.

Os resultados do grupo SHAM concordam com Tromm *et.al.* e Hamilton *et. al.* (85, 97) nos quais o exercício foi fator determinante no aumento da atividade da SOD, sendo que sua associação com a PBMT também demonstrou resultado positivo, necessitando de investigação sobre os efeitos da L-Arginina na capacidade antioxidante mesmo com a atividade física sendo realizada.

O incremento no consumo de oxigênio constitui fator que predispõe à geração de agentes oxidantes no exercício aeróbico, sendo que a regulação do estresse oxidativo envolve amplo espectro de antioxidantes dietéticos exógenos e endógenos, dentre os quais encontram-se as enzimas GPx e SOD (95).

A atividade da SOD demonstrou um aumento da capacidade antioxidante no grupo PBMT e no grupo de associação entre PBMT e L-Arginina, condizente com resultados obtidos por Leal Junior (11).

Shan L *et. al.*(82) demonstraram que a suplementação de L-Arginina efetivamente reduz o desequilíbrio induzido pelo exercício entre a capacidade de defesa de estresse oxidativo e antioxidantes, demonstrando que a suplementação com a L-Arginina previne elevações de EROs e melhora a capacidade de defesa antioxidante durante o exercício físico.

Neste estudo os resultados obtidos pelo grupo L-Arginina foram inferiores aos associados a PBMT, já que no grupo L-Arginina houve uma capacidade de

defesa antioxidante inferior a apresentada pelos grupos PBMT e PBMT associado a L-Arginina, levantando o questionamento se o uso da PBMT é mais eficaz do que da suplementação com L-Arginina no que diz respeito a ação antioxidante.

O uso da PBMT aumentou os níveis da enzima antioxidante GPx neste estudo, como pode-se notar na Figura 11. Os níveis elevados de GPx no grupo PBMT demonstram que o estresse oxidativo causado pelo exercício aeróbico associado a aplicação da PBMT otimizou a capacidade antioxidante desses animais (8, 67, 95), já o grupo L-Arginina obteve um resultado negativo da capacidade antioxidante mensurada pelos níveis de GPx.

Este resultado referente a GPx contradiz estudos que afirmam que o uso da L-Arginina auxilia na proteção muscular via redução do estresse oxidativo. Este resultado pode ter sido devido a dosagem utilizada (15,40, 70, 103).

Com relação aos grupos L-Arg e PBMT + L-Arg, a redução da SOD e o aumento da MDA pode ter relação direta com a intensidade da força no resultado de Fmax destes grupos.

Um estudo observou o aumento na geração de EROs em diversas situações patológicas e fisiológicas, dentre as quais o exercício físico aeróbico demonstrou estar associado à maior produção de EROs, que é diferentemente expressa de acordo com o tipo, intensidade e duração da atividade (99).

Neste trabalho o grupo SHAM foi o que não recebeu tratamento ou suplementação mas denota uma população que praticou o exercício aeróbico, e foi demonstrado que o exercício aeróbico promove uma capacidade antioxidante e atenua o estresse oxidativo em músculo esquelético (100), o que pode justificar os níveis de MDA , SOD e GPx demonstrados.

Não foi possível comparar os resultados obtidos com um grupo sedentário, excluindo assim o efeito do exercício aeróbico no estresse oxidativo e elucidando os efeitos do exercício isolado e da sua associação com PBMT e L-Arginina.

O exercício, seja aeróbico ou resistido, quando realizado em frequência e intensidade adequadas, pode melhorar tanto os mecanismos de defesa antioxidantes (86, 87), como a capacidade oxidativa do tecido (88), podendo

diminuir a magnitude do ataque oxidativo (85, 89, 105) e prevenir efeitos deletérios decorrentes do mesmo (15, 85, 91).

Em referência ao protocolo utilizado de atividade aeróbica, o estudo experimental realizado por Deschenes *et. al.* (101) foi realizado um protocolo de exercício em esteira 5 dias na semana durante 8 semanas buscando determinar a adaptabilidade do sistema neuromuscular aos estímulos de treinamento de exercício e envelhecimento, os animais tinham idade mais avançada e foram avaliados outros aspectos da realização do exercício físico, porém o tempo de treinamento foi maior.

Em estudo realizado por Sato *et. al.* (102), que utilizaram um protocolo de 28 dias treinando animais em esteira a uma velocidade de 10 m/min por 30 min sob os choques elétricos, demonstraram que a motivação e o estresse afetaram recuperação motora, mas os mecanismos específicos envolvidos permanecem desconhecidos.

Vieira *et.al.* (105), também em estudo experimental, submete ratos a treinamento aeróbico em esteira, com período de adaptação do exercício e aplicação da PBMT, avalia o padrão eletroforético da LDH em resposta ao exercício e a PBMT.

Neste estudo levou-se em consideração o estudo de Kryściak *et. al.* que compararam treinos de 2, 4 e 8 semanas em esteira ergométrica e apontaram efeitos positivos da adaptação do tecido muscular de ratos com 4 semana de treino (74).

Ao avaliar os aspectos morfológicos e presença de infiltrado inflamatório através da análise histológica do músculo tibial anterior destes animais pode-se notar que o tecido muscular após a realização do protocolo de exercício e de fadiga muscular induzida indiretamente a partir da estimulação do nervo ciático não houve atrofia ou hipertrofia muscular, não havendo diferença significativa destes achados.

Sobre os achados histológicos todos os animais apresentaram células inflamatórias perivasculares, mastócitos e neutrófilos, sem demais diferenças significativas do tecido entre os grupos, havendo assim a necessidade de uma

avaliação imuno-histoquímica do tecido para avaliar as diferenças apresentadas.

Neste estudo a PBMT foi utilizada com comprimento de onda 808 nm, 4 J por ponto, sendo aplicada em 5 pontos no músculo tibial anterior, buscando alcançar a energia total de 20 joules, com embasamento, neste caso, no estudo realizado por Oliveira *et al.* (61) que investigou a melhor dose para aplicação de PBMT na prática de exercício físico resistido, foi demonstrado que a irradiação de 4J possui efeito protetor significativo e sua aplicação teve efeitos benéficos antes ou após o exercício.

Portanto, atletas de resistência ou praticantes de exercício físico podem apresentar danos musculares menores ou recuperação acelerada quando submetidos à PBMT. Foi sugerido que a PBMT tem um padrão bifásico de dose-resposta. Isso significa que doses baixas de energia levam a nenhum efeito, doses de energia intermediária levam a um efeito estimulador e altas doses levam à inibição de atividade celular (77).

Ainda em relação a dosimetria, Leal Junior *et al.* (33), submetendo ratos a contrações tetânicas após aplicação de PBMT, afirmaram que as doses ideais para prevenir a fadiga muscular com comprimento de onda de 904 nm variaram de 0,1 a 1 J.

Em estudo de Lopes-Martins e colaboradores (69) foram comparados alguns parâmetros avaliando recuperação do músculo após a fadiga, a irradiação de 904 nm apresentou resultados significativamente melhores com uma redução de 15-24% de sua respectiva atividade de CK pré-contração tetânica, enquanto a irradiação de 655 nm com doses ideais apenas reduziu o aumento esperado na atividade de CK para 32-35%, indicando um efeito protetor da irradiação a laser no desenvolvimento de danos musculares esqueléticos durante e após contrações tetânicas (33, 76).

## **7. CONCLUSÃO**

Como conclusão deste estudo podemos notar que o uso de PBMT associado à L-Arginina atenuou a fadiga muscular em muitos aspectos, melhorou a amplitude da força de contração e a recuperação muscular após as contrações tetânicas induzidas, além de preservar o tecido muscular indicado pelos resultados histológicos normais e pela redução dos níveis de CK. Contudo, a resistência a fadiga foi reduzida no grupo de associação entre PBMT e L-Arginina seguido da redução na concentração de SOD e do aumento dos níveis de MDA. Os animais que receberam suplementação com a L-Arginina apresentaram aumento da força de contração máxima e diminuição da resistência a fadiga na última contração tetânica e similarmente aos grupos tratados, apresentou melhora na recuperação muscular, indicada pelo aumento da força de contração basal registrada após cada tetania, resultados que demonstraram de modo geral que houve a prevenção da fadiga muscular e aumento da força de contração muscular após a realização de exercício aeróbico associado a PBMT e L-Arginina.



## 8. REFERÊNCIAS

1. Ascensão A, Leite M, Rebelo AN, Magalhães S, & Magalhães J. (2011). Effects of cold water immersion on the recovery of physical performance and muscle damage following a one-off soccer match. *Journal of Sports Sciences*, 29(3), 217–225.
2. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, De Marchi T, Baroni BM, Taufer D, Manfro DS, Rech M, Danna V, Grosselli D, Generosi RA, Labat RM, Ramos L, Bjordal JM. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci* (2009) 24:857–863.
3. Barnett A. (2006). Using Recovery Modalities between Training Sessions in Elite Athletes. *Sports Medicine*, 36(9), 781–796.
4. Ament W, & Verkerke GJ (2009). Exercise and Fatigue. *Sports Medicine*, 39(5), 389-422.
5. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM, “Creatine kinase monitoring in sport medicine,” *Br Med Bull*, 81-82. 209-230. 2007.
6. Borsa PA, Larkin KA, True JM (2013). Does phototherapy enhance skeletal muscle contractile function and postexercise recovery? A systematic review. *J Athl Train* 48:57–67
7. Santos LA, Marcos RL, Tomazoni, SS, Vanin AA, Antonialli FC, Grandinetti VS, Leal-Junior ECP (2014). Effects of pre-irradiation of low-level laser therapy with different doses and wavelengths in skeletal muscle performance, fatigue, and skeletal muscle damage induced by tetanic contractions in rats. *Lasers in Medical Science*, 29(5), 1617–1626.
8. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006;36(4):327-58.
9. Clarkson PM, & Hubal MJ (2002). Exercise-Induced Muscle Damage in Humans. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 81(Supplement), S52–S69.
10. Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev. American, Physiological Society*; 2008; 88: 287±332.
11. Leal-junior ECP, Vanin AA, Miranda ED, Carvalho PTC, Dal Corso S, Bjordal JM (2013). Effect of phototherapy (low level laser therapy and light emitting diodo therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: A systematic review with meta-analyses. *Lasers Med Sci* (30).925-939.
12. Ferraresi C, Huang YY, & Hamblin MR (2016). Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? *Journal of Biophotonics*, 9(11-12), 1273–1299.
13. Zalpour C, Van Beek E. *Anatomia e fisiologia para fisioterapeutas*. Livraria Santos Editora, 2005.
14. Guyton AC, Hall JE. *Tratado De Fisiologia Médica* 3. Ed. Elsevier, 2017.
15. Ranjbar K, Nazem F, Sabrinezhad R, & Nazari A (2018). Aerobic training and L-arginine supplement attenuates myocardial infarction-induced kidney and liver injury in rats via reduced oxidative stress. *Indian Heart Journal*, 70(4), 538–543.
16. Frontera WR, & Ochala J. (2014). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183–195.

17. Gelfi C, Vasso M, & Cerretelli P (2011). Diversity of human skeletal muscle in health and disease: Contribution of proteomics. *Journal of Proteomics*, 74(6), 774–795.
18. Greising SM, Gransee HM, Mantilla CB, & Sieck GC (2012). Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*.
19. J Wan, Qin Z, Wang PY, Sun Y, Liu X. Muscle fatigue: general understanding and treatment. *Experimental & Molecular Medicine* (2017) 49, e384; Official journal of the Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology
20. Roberts TJ, Eng CM, Sleboda DA, Holt NC, Brainerd EL, Stover KK, Azizi E (2019). The Multi-Scale, Three-Dimensional Nature of Skeletal Muscle Contraction. *Physiology*, 34(6), 402–408.
21. Aagaard P, Simonsen EB, Andersen JL, Magnusson P, & Dyhre-Poulsen P (2002). Increased rate of force development and neural drive of human skeletal muscle following resistance training. *Journal of Applied Physiology*, 93(4), 1318–1326.
22. Taylor JL, Amann M, Duchateau J, Meeusen R, Rice CL. Neural contributions to muscle fatigue: from the brain to the muscle and back again. *Med Sci Sport Exer.* 2016; 48: 2294±2306.
23. Kent-Braun JA, Fitts RH, Christie A. Skeletal muscle fatigue. *Compr Physiol.* 2012; 2: 997±1044.
24. Fitts RH (2008) The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *J Appl Physiol* 104:551–558. <https://doi.org/10.1152/jappliedphysiol.01200.2007>
25. Westerblad H (2016) Acidosis is not a significant cause of skeletal muscle fatigue. *Med Sci Sports Exerc* 48:2339–2342.
26. Cè E; Longo, S *et. al.* Peripheral fatigue: new mechanistic insights from recent technologies. *European Journal of Applied Physiology*
27. Pajoutan M, Ghesmaty Sangachin M, & Cavuoto LA (2017). Central and peripheral fatigue development in the shoulder muscle with obesity during an isometric endurance task. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 18(1).
28. Potvin JR, Fuglevand AJ. A motor unit-based model of fatigue, 2017. *PLoS Comput Biol* 13(6): e1005581.
29. Carroll TJ, Taylor JL, & Gandevia, SC (2017). Recovery of central and peripheral neuromuscular fatigue after exercise. *Journal of Applied Physiology*, 122(5), 1068–1076.
30. Bigland-ritchie B; Jones DA, Woods JJ. Excitation frequency and muscle fatigue: electrical responses during human voluntary and stimulated contractions. *Exp Neurol* 64:414-427,1979.
31. Bokov P, & Delclaux C (2019). Impact fonctionnel respiratoire de l'obésité. *Revue Des Maladies Respiratoires*.
32. Cassilhas RC, Tufik S, & De Mello MT (2015). Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(5), 975–983.
33. Leal-junior EC, Godoi V, Mancalossi JL, Rossi RP, De Marchi T, Parente M, Groselli D, Generosi RA, Basso M, Frigo L, Tomazoni SS, Bjordal JM, Brandão RA, Martins L(2011). Comparison between cold water Immersion therapy (CWIT) and light emitting diode therapy (LEDT) in

- short-term skeletal muscle recovery after high-intensity exercise in athletes – preliminary results. *Lasers Med Sci* (26):493-501.
34. Nunes FL, Dantas MO, Queiroz IKA, Silva LC, Silva LC, Souza FS, Alves MB (2015). Atividade sérica de enzimas musculares Ast, LDH e CK em equinos submetidos a diferentes tipos de esforço físico na região de Imperatriz MA. *Pub Vet* . 9(12): 511-520.7
  35. Bessa AL, Oliveira VN, Agostini G, Oliveira RJS, Oliveira ACS, White GE, Espindola FS (2016). Exercise Intensity and Recovery. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 30(2), 311–319.
  36. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R345–R353, 2005.
  37. Khairova R, Pawar R, Salvadore G, Juruena MF, Sousa RT, Souza MGS, Salvador M, Zarate CA, Gattazw F, Vieira RM (2012). Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Molecular Med Reports* (5):680-682.
  38. Davis JK, Green JM. Caffeine and anaerobic performance: Ergogenic value and mechanisms of action. *Sports Med* 39: 813–832, 2009.
  39. Vaczi M, Tihanyi J, Hortobagyi T, Racz L, Csende Z, Costa A, Pucsok J. Mechanical, Biochemical, and electromyographic responses to short-term eccentric-concentric knee extensor training in humans. *J Strength Cond Res* 2010.
  40. Coman D, Yaplito-lee J, Boneh A. New indications and controversies in arginine therapy. *Clin Nutr* 2008;27:489-96.
  41. Andersen LL, Jay K, Andersen CH, Jakobsen MD, Sundstrup E, Topp R, Behm DG (2013). Acute effects of massage or active exercise in relieving muscle soreness: randomized controlled trial. *J. Strength Cond Res* . 27(12): 3352–3359.
  42. Broatch JR, Petersen A, Bishop DJ (2018). The influence of post-exercise cold water immersion on adaptive responses to exercise: A review of the literature. *Sports Medicine* 48 (405): 01-19
  43. D'Amico A, Paolone V (2017). The effect of foam rolling on recovery between two eight hundred metre runs. *Journal of Human Kinetics* . 57: 97-105.
  44. Kim J, Kim S, Lee J (2016). Longer application of kinesio taping would be beneficial for exercise-induced muscle damage. *Journal of Exercise Rehabilitation*. 12(5):456-462.
  45. Poppendieck W, Wegmann M, Ferrauti A, Kelmann M, Pfeiffer M, Meyer T (2016). Massage and performance recovery: A Meta-Analytical Review. *J Sports Med*. 46(2): 183-204.
  46. Nicastro H, Dattilo M, Rogero MM. A suplementação de L-Arginina promove implicações ergogênicas no exercício físico? Evidências e considerações metabólicas. *Rev Bras Ci e Mov* 2008;16:115-22.
  47. Weisinger H. Arginine Metabolism and synthesis of the nitric oxide. *Prog Neurobiol* 2001;64:365-91.
  48. Meneilly GS, Battistini B, Flora JS. Contrasting effects of L-arginine on insulin-mediated blood flow and glucose disposal in the elderly. *Metabolism* 2001;50:194-9.
  49. Angeli G, Barros TL, Barros DFL, Lima M. Investigação dos efeitos da suplementação oral de L-Arginina no aumento de força e massa muscular. *Rev Bras Med Esporte* 2007;13:129-32.

50. Salvetti, AR. A História da Luz. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008, p.19.
51. Russo, L. The forgotten revolution: how science was born in 300 bc and why it had to be born. Berlin: Springer-Verlag, 2004.
52. Capra, F. Learning from Leonardo: decoding the notebooks of a Genius, San Francisco: Berrett-Koehler Publishers, 2007.
53. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*. 1960; 187:493-4.
54. Grande M, Facchini F, Moretti M, Larosa M, Leone M, Ziglioli F, Frattini A (2014). History of Laser in BPH therapy. *Urologia Journal*, 81(23\_suppl), S38–S42. doi:10.5301/ru.2014.11985
55. Palanker, D. (2016). Evolution of Concepts and Technologies in Ophthalmic Laser Therapy. *Annual Review of Vision Science*, 2(1), 295–319. doi:10.1146/annurev-vision-111815-114358
56. Deana, AM. Biofotônica: Conceitos e aplicações – capítulo 1- Introdução à Biofotônica: breve histórico, São Paulo, UNINOVE, 2017, p. 11.
57. Little HL, Zweng HC, Peabody RR. 1970. Argon laser slit-lamp retinal photocoagulation. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 74:85–97
58. Patz A, Maumenee AE, Ryan SJ. 1971. Argon laser photocoagulation. Advantages and limitations. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 75:569–79
59. Pomerantzeff O, Lee PF, Hamada S, Donovan RH, Mukai N, Schepens CL. 1971. Clinical importance of wavelengths in photocoagulation. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 75:557–68
60. Mendonça FS, Carvalho PTC, Biasotto-Gonzalez DA, Calamita SAP, Paula Gomes, CAF, Amorim CF, Fumagalli MA, Politti F. Muscle fiber conduction velocity and EMG amplitude of the upper trapezius muscle in healthy subjects after low-level laser irradiation: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Lasers in Medical Science*, 2017.
61. De Oliveira HA, Antonio EL, Silva FA, De Carvalho PTC, Feliciano R, Yoshizaki A, Vieira SS, Melo BL, Leal-Junior ECP, Labat RM, Bocalini, DS, Silva Junior JA, Tucci PJF, Serra AJ (2018): Protective effects of photobiomodulation against resistance exercise-induced muscle damage and inflammation in rats, *Journal of Sports Sciences*
62. Isman E, Aras MH, Cengiz B *et. al.* (2015) Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1064 nm) on transient receptor potential melastatin channels in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci* 30:1489–1495
63. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E *et. al.* (2013) Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther* 15:R116
64. Jang H, Lee H . Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas. *Photomed Laser Surg* 30:405–417, (2012).
65. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD *et. al.* (2017) Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* 1–34.

66. Nampo FK, Cavalheri V, Dos Santos Soares F et al (2016) Low level phototherapy to improve exercise capacity and muscle performance: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* 31: 1957–1970
67. Guaraldo SA, Serra AJ, Amadio EM, Antônio EL, Silva F, Portes LA, De Carvalho PT (2016). The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: An aerobic exercise. *Lasers in Medical Science*, 31(5), 833–840.
68. Manchini MT, Serra AJ, Feliciano RS, Santana ET, Antônio EL, Carvalho de PTC, Silva JA (2014). Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *PLoS One*, 9(7), e101270.
69. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscara MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM (2006) Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol* 101:283–288
70. Melo MPP, Vasconcelos ACS, Santos PCP, Monteiro HMC, Santos AA, Maia LMSS. L-arginine and physical exercise interference on the morphology of the skeletal muscle in young rats. *Rev bras med esporte – vol. 19, no 4 – jul/ago, 2013*
71. Szymczyszyn A, Doroszko A, Szahidewicz-Krupska E, Rola P, Gutherc R, Jasiczek J, Derkacz A (2016). Effect of the transdermal low-level laser therapy on endothelial function. *Lasers in Medical Science*, 31(7), 1301–1307.
72. Rizzi M, Migliario M, Tonello S, Rocchetti V, & Renò F. (2018). Photobiomodulation induces in vitro re-epithelialization via nitric oxide production. *Lasers in Medical Science*, 33(5), 1003–1008.
73. Ramos L, Labat RM, Carvalho FAS, Martin AB, Lopes-Martins RA. Efeito da administração oral de L-Arginina sobre a pressão arterial e parâmetros cardíacos em ratos submetidos ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico. *Rev Bras Med Esporte – Vol 12, nº 4, Jul/Ago, 2006.*
74. Kryściak K, Majerczak J, Kryściak J, Łochyński D, Kaczmarek D, Drzymała-Celichowska H, Celichowski J. (2018). Adaptation of motor unit contractile properties in rat medial gastrocnemius to treadmill endurance training: Relationship to muscle mitochondrial biogenesis. *PLOS ONE*, 13(4), e0195704.
75. Russ DW, Acksel C, McCorkle KW, Edens NK, & Garvey SM. (2016). Effects of running wheel activity and dietary HMB and B—alanine co-supplementation on muscle quality in aged male rats. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 21(5), 554–561.
76. De Almeida P, Lopes-Martins RA, Tomazoni SS, Silva Jr JA, De Carvalho PTC, Bjordal JM, Leal-Junior ECP. Low-level Laser Therapy Improves Skeletal Muscle Performance, Decreases Skeletal Muscle Damage and Modulates mRNA Expression of COX-1 and COX-2 in a Dose-dependent Manner. *Photochemistry and Photobiology*, 2011, 87: 1159–1163
77. Huang YY, Chen AC, Carroll JD et al (2009) Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response* 7:358–383

78. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Dalan F et al (2008). Effect of 655-nm low-level laser therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Photomed Laser Surg* 26:419–424
79. Dos Reis FA, da Silva BAK, Laraia EMS, de 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. *Photomedicine and laser surgery*. 2014;32(2):106-12.
80. Gorgey AS, Wadde NA, Sobhi NN (2008). The effect of low level laser therapy on electrically induced muscle fatigue: a pilot study. *Photomed Laser Surg* 26:501–506
81. Silva EP, Borges LS, Mendes da Silva C, Hirabara SM, & Lambertucci RH (2017). L-Arginine supplementation improves rats' antioxidant system and exercise performance. *Free Radical Research*, 51(3), 281–293.
82. Shan L, Wang B, Gao G, Cao W, & Zhang Y (2013). L-Arginine supplementation improves antioxidant defenses through L-arginine/nitric oxide pathways in exercised rats. *Journal of Applied Physiology*, 115(8), 1146–1155.
83. Lomonosova YN, Shenkman, BS, Kalamkarov GR, Kostrominova TY, & Nemirovskaya TL. (2014). L-arginine Supplementation Protects Exercise Performance and Structural Integrity of Muscle Fibers after a Single Bout of Eccentric Exercise in Rats. *PLoS ONE*, 9(4), e94448.
84. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;36(10):1329-41.
85. Tromm CB, Rosa GLD, Bom K, Mariano I, Pozzi B, Tuon T, *et. al.* Efeito de diferentes frequências semanais de treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano*. 2012;14(1):52-60.
86. Silva LA, Rosani MM, Souza PS, Severino JB, Fraga D, Streck EL, *et al.* Comparação do treinamento físico de quatro e oito semanas sobre a atividade da cadeia transportadora de elétrons e marcadores de estresse oxidativo em fígado de camundongos. *Rev Bras Med Esporte* 2010;16:126-9.
87. Husain K, Somani SM. Interaction of exercise and adenosine receptor agonist and antagonist on rat heart antioxidant defense system. *Mol Cell Biochem* 2005;270:209-14.
88. Silva LA, Pinho CA, Scarabelot KS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2009;105:861-7.
89. Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, *et al.* Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 2006;30:848-53.
90. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 2008;88(4):1243-76.
91. Frederico M, Luz G, Justo SL, Silva S, Medeiros C, Barbosa VA, *et. al.* Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive



- oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol. *Free Radic Res* 2009;11:1-8.
92. Schneider CD, Oliveira ARD. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte São Paulo*, BR Vol 10, n 4 (jul/ago 2004), p 308-313. 2004.
  93. Dunlop RA, Brunk UT, Rodgers KJ. Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB life*. 2009;61(5):522-7.
  94. Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Canadian journal of applied physiology*. 2004;29(3):245-63.
  95. De Marchi T, Junior ECPL, Bortoli C, Tomazoni SS, Lopes-Martins RÁB, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers in medical science*. 2012;27(1):231-6.
  96. Muller FL *et al.* (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1993-2004
  97. Hamilton KL, Powers SK, Sugiura T, Kim S, Lennon S, Tumer N, et al. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:1346-52.
  98. Tiidus PM, Houston ME. Antioxidant and oxidative enzyme adaptations to vitamin E deprivation and training. *Med Sci Sports Exerc* 1994;26:354-9.
  99. Steinbacher P, Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules*. 2015;5(2):356-77.
  100. Linke A, Adams V, Schulze PC, et al. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*. 2005;111(14):1763–1770.
  101. Deschenes MR, Li S, Adan MA, Oh JJ, & Ramsey HC (2018). Muscle fibers and their synapses differentially adapt to aging and endurance training. *Experimental Gerontology*, 106, 183–191.
  102. Chihiro Sato C, Kunikazu Tanji K, Shuji Shimoyama S, Mitsuru Chiba M, Misaki Mikami M, Koeda S, Sumigawa K, Akahira K, Yamada J. Effects of voluntary and forced exercises on motor function recovery in intracerebral hemorrhage rats. *NeuroReport* 2019.
  103. Hambrecht R, Hilbrich L, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Schoene N, et al. Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):706-13.
  104. Zangaro RA, Pacheco MTT. *Isokinetics and Exercise Science*. 2002;153-8.
  105. Vieira WHB, GOES R, COSTA FC, PARIZOTTO NA, PEREZ SEA, BALDISSERA V, MUNIN FS, SCHWANTES MLB. Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos treinamento aeróbico em esteira e laser de baixa intensidade. *Rev. bras. fisioter.* Vol. 10, No. 2 (2006), 205-211.

## 9- ANEXOS

### 9.1- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética no  
Uso de Animais

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O efeito da fotobiomodulação na fadiga muscular", protocolada sob o CEUA nº 7500280618 (10 000045), sob a responsabilidade de **Paulo de Tarso Camillo de Carvalho e equipe; Pamella Gabriela dos Santos Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 15/08/2018.

We certify that the proposal "The effect of photobiomodulation on muscle fatigue", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 7500280618 (10 000045), under the responsibility of **Paulo de Tarso Camillo de Carvalho and team; Pamella Gabriela dos Santos Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 08/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2018** a **12/2019**

Área: **Ciências da Reabilitação**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **60 a 120 dias**

N: **24**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 300 g**

Local do experimento: **Biotério - Unidade Vergueiro**

São Paulo, 13 de junho de 2020

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho