

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**ANDRÉIA MARTINELLI DE SIQUEIRA ARAUJO**

---

---

**EFEITO COMPARATIVO DA FOTOBIMODULAÇÃO LOCAL E VASCULAR  
SISTÊMICA DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA  
COMPENSATÓRIA DO MÚSCULO PLANTAR EM RATOS**

---

---

**SÃO PAULO, SP**

**2022**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**ANDRÉIA MARTINELLI DE SIQUEIRA ARAUJO**

---

---

**EFEITO COMPARATIVO DA FOTOBIMODULAÇÃO LOCAL E VASCULAR  
SISTÊMICA DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA  
COMPENSATÓRIA DO MÚSCULO PLANTAR EM RATOS**

---

---

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de doutora em Ciências da Reabilitação pela Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**

**SÃO PAULO, SP**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

Araujo, Andréia Martinelli de Siqueira.

Efeito comparativo da fotobiomodulação local e vascular sistêmica durante o processo de hipertrofia compensatória do músculo plantar em ratos. / Andréia Martinelli de Siqueira Araujo. 2022

88 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2022.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

1. Músculo plantar. 2. Hipertrofia. 3. Fotobiomodulação. 4. Terapia com luz em baixa intensidade. 5. Fotobiomodulação vascular.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita.

II. Título.

CDU 615.8

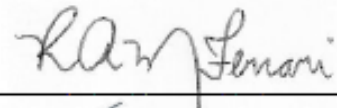
São Paulo, 21 de junho de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): ANDRÉIA MARTINELLI DE SIQUEIRA ARAUJO

Título da Tese: "Efeito Comparativo da Fotobiomodulação Local e Vascular Sistêmica Durante o Processo de Hipertrofia Compensatória do Músculo Plantar Em Ratos"

Presidente: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROFA. DRA. RITA DE CÁSSIA MARQUETI DURIGAN



## DEDICATÓRIA

---

*À Deus, por sua grandeza insondável.*

*Aos meus filhos, os quais me inspiram a sempre tentar outra vez.*

*À minha família, a quem devo muito do que sou e por serem meu pilar e um porto seguro.*

## AGRADECIMENTOS

---

*À Deus, por acreditar que todas as coisas são feitas por Ele e para Ele e que sem Ele nada do que existe jamais poderia existir.*

*À Universidade Nove de Julho (UNINOVE), pela infraestrutura e concessão da bolsa.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, a quem tenho profunda admiração. Agradeço por todo conhecimento transmitido nesse período, por todo apoio, paciência e confiança em todos os momentos.*

*Aos professores da pós-graduação, por todo conhecimento e auxílio transmitido ao longo desse período.*

*Aos membros da banca, Profa. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan e prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, por aceitarem avaliar meu trabalho e por muito contribuírem para o enriquecimento científico desta pesquisa. Registro aqui meu respeito e admiração por vocês.*

*Aos amigos de Laboratório, Valéria Grégio, Stella Maris, Renata, Patricia, Dowglas, Kaline, Talita Lopes, Tamiris, Daysi, Tamires e Marcelo por de alguma forma terem me auxiliado ou me ensinado algo novo.*

*Ao meu irmão acadêmico, Dr. Lucas Andreo, obrigada por tudo, por sempre estar ao meu lado e não soltar minhas mãos nos dias mais difíceis, por dedicar parte de seu tempo para me ajudar não importando o dia e nem a hora, pelas palavras de apoio quando precisei em certos momentos e por tantas e tantas palavras e atitude de carinho para comigo durante esses anos. Você é um querido amigo. Sempre serei grata você.*

*À minha irmã acadêmica, Mr Tainá Caroline dos Santos Malavazzi, pensa em uma pessoa meiga, simpática e extremamente competente. Nossa, como ela me auxiliou por diversas vezes. Foi um prazer te conhecer e trabalhar em parceria com você durante esses anos.*

***À minha amiga*** Dra. Solange Almeida, uma pessoa querida, que muito me ouviu e me apoiou ao longo dessa minha trajetória acadêmica. Amiga você é uma querida que vou levar para a vida toda.

***Aos técnicos do laboratório de pesquisa da UNINOVE,*** por serem sempre solícitos a tudo que precisei para realização desse trabalho.

***Aos alunos de iniciação científica,*** que sempre estavam colaborativos e dispostos a aprender o que fosse preciso para a realização desse trabalho.

***À minha família,*** pessoas mais que especiais nessa trajetória. Minha mãe e pai duas pessoas fortes e resilientes, um exemplo para mim. Meus filhos e marido os quais amo, me dedico e sempre lutarei por vocês. Minhas irmãs e sobrinhas pessoas tão importantes em minha vida. Obrigada família por serem a minha base, por acreditarem em mim, por me apoiarem na busca dos meus sonhos e por entenderem a minha ausência em certos momentos para que eu chegasse até aqui.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus não sou o que era antes”. – Martin Luther King*



## RESUMO

---

A hipertrofia compensatória (HC), é uma adaptação que ocorre no músculo em resposta a sobrecarga, resultando no aumento do tamanho da fibra muscular. A Fotobiomodulação (FBM), demonstrou efeitos positivos sobre o músculo esquelético durante a HC incluindo a modulação de citocinas inflamatórias, redução do colágeno e aumento da área de secção transversa (AST). O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da FBM vascular transcutânea sistêmica (FBMV) e da FBM local (FBML) infravermelha sobre as alterações morfológicas e funcionais no tecido muscular durante o processo de HC em ratos. Foram utilizados 35 ratos Wistar, divididos em 4 grupos: Controle (n=5); Hipertrofia (H) (n=10), Hipertrofia + Fotobiomodulação vascular (H + FBMV) (n=10) e Hipertrofia + Fotobiomodulação local (H + FBML) (10). A hipertrofia foi induzida pelo modelo de ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar. A FBML foi realizada com um laser em baixa intensidade (AsGaAl,  $\lambda$  780 nm; 40 mW; densidade de energia 10 J/cm<sup>2</sup>; 10 segundos em cada ponto; 8 pontos sobre a região do músculo plantar; 3.2 J) e a FBMV nos parâmetros de 80 J/cm<sup>2</sup>, 40mW, por 80 segundos em um único ponto, 3,2 J, aplicada sobre a veia caudal. Os animais foram avaliados após 7 e 14 dias de aplicação da FBM quanto a capacidade funcional da marcha e a sensibilidade mecânica utilizando respectivamente o teste de índice funcional do ciático (IFC) e o teste de von Frey. Após essas avaliações os animais foram eutanasiados e os músculos plantares foram removidos e utilizados para as análises que incluíram a determinação da relação do peso dos músculos esquerdo e direito (D/E) e a análise dos aspectos morfológicos por técnica de histologia com coloração HE para determinação da AST e diâmetro das fibras musculares. A análise histológica demonstrou um aumento da AST após 7 e 14 dias no grupo H+FBMV em comparação ao grupo somente H e um aumento da AST no grupo H+FBMV quando comparado ao grupo H+FBML após 14 dias. Após 7 dias houve um aumento no diâmetro das fibras musculares no grupo H+FBMV quando comparado ao grupo H, e aos 14 dias um aumento do diâmetro das fibras foi encontrado em ambos os grupos que receberam FBM (H+FBML e H+FBMV) quando comparados ao grupo não irradiado (H), sendo este aumento mais pronunciado no grupo FBMV em relação ao grupo FBML. A relação de massa (D/E) nos grupos H, H+FBML e H+FBMV reduziu quando comparada ao grupo controle após 7 dias. Aos 14 dias houve redução desta relação nos grupos H e H+FBML em comparação ao grupo controle e manutenção no grupo H+FBMV apresentando valores de massa que não diferiram dos valores do grupo controle. Com relação a sensibilidade mecânica ambos os grupos H e irradiados apresentaram redução da sensibilidade em relação ao grupo controle após 7 e 14 dias e não houve diferença entre os grupos H, H+FBMV e H+FBML em nenhum dos períodos experimentais. Na análise funcional da marcha (IFC), todos os grupos apresentaram menor funcionalidade quando comparados ao grupo controle após 7 dias. Em 14 dias ambos os grupos irradiados, FBML e FBMV restabeleceram o índice normal de funcionalidade apresentando valores próximos aos do grupo controle e o grupo H permaneceu com escores maiores quando comparado ao grupo controle. Em conclusão, ambas as formas de irradiação modularam de forma positiva o processo de recuperação funcional e os aspectos morfológicos musculares durante a HC. A comparação de ambas as irradiações permitiram

evidenciar efeitos mais pronunciados da FBMV no que se refere ao aumento da AST, diâmetro das fibras e manutenção do volume de massa e resultados semelhantes para as duas formas, local e vascular, no que se refere aos aspectos de sensibilidade mecânica e ao restabelecimento do índice normal de funcionalidade da marcha.

**Palavras-chave:** Músculo plantar; hipertrofia; fotobiomodulação; terapia com luz em baixa intensidade; fotobiomodulação vascular.

## ABSTRACT

---

Compensatory hypertrophy (CH) is an adaptation that occurs in the muscle in response to overload, resulting in an increase in muscle fiber size. Photobiomodulation (PBM) has demonstrated positive effects on skeletal muscle during the HC process including modulation of inflammatory cytokines, collagen reduction and increase in cross-sectional area (CSA). The aim of this study was to compare the effects of systemic transcutaneous vascular photobiomodulation (VPBM) and infrared local PBM (LPBM) on morphological and functional changes in muscle tissue during the HC process in rats. Thirty-five Wistar rats were used, divided into 4 groups: Control (n=5); Hypertrophy (H) (n=10), Hypertrophy + vascular photobiomodulation (H + PBMV) (n=10) and Hypertrophy + local photobiomodulation (H + LPBM) (10). Hypertrophy was induced by the ablation model of the synergistic muscles of the plantar. Local PBM was performed with a low-intensity laser (AsGaAl,  $\lambda$  780 nm; 40 mW; radiant exposure 10 J/cm<sup>2</sup>; 10 seconds at each point; 8 points over the plantar region; 3.2 J) and vascular PBM at the parameters of 80 J/cm<sup>2</sup> .40mW, for 80 seconds in a single point, 3.2 J, applied over the caudal vein. The animals were evaluated after 7 and 14 days of PBM application for gait functional capacity and mechanical sensitivity using the sciatic functional index (SFI) test and the von Frey test, respectively. After these evaluations, the animals were euthanized and the plantar muscles were removed and used for analyzes that included the determination of the weight ratio of the left and right muscles (L/R) and analysis of morphological aspects by histology technique with staining H&E for determination of CSA and muscle fiber diameter. Histological analysis showed an increase in CSA in the H+PBMV group compared to the H group after 7 and 14 days and an increase in CSA in the H+VPBM group when compared to the H+LPBM group after 14 days. After 7 days there was an increase in muscle fiber diameter in the H+PBMV group when compared to the H group, and at 14 days an increase in fiber diameter was found in both groups that received PBM (H+LPBM and H +VPBM) when compared to the non-irradiated group (H), this increase being more pronounced in the PBMV group compared to the PBML group. The mass ratio (R/L) in groups H, H+LPBM and H+VPBM reduced when compared to the control group after 7 days. At 14 days, there was a reduction in this relationship in groups H and H+LPBM compared to the control group and maintenance in the H+VPBM group showing mass values that did not differ from the values of the control group. Regarding mechanical sensitivity, both H and irradiated groups showed a reduction in sensitivity compared to the control group after 7 and 14 days and there was no difference between groups H, H+VPBM and H+LPBM in any of the experimental periods. In the functional analysis of gait (SFI), all groups showed lower functionality when compared to the control group after 7 days. In 14 days, both irradiated groups reestablished the normal functionality index, close to the control group. Group H remained with higher scores when compared to the control group. In conclusion, both forms of irradiation positively modulate the recovery process and the morphological aspects of functionality during a HC. The comparison of both irradiations showed more pronounced effects of VPBM with regard to the increase in CSA, fiber diameter and maintenance of mass volume and similar results for both forms, local and vascular, with regard to aspects of sensitivity mechanics and the reestablishment of the normal index of gait functionality.

**Keywords:** Plantar muscle; hypertrophy; photobiomodulation; low-level light therapy; vascular photobiomodulation.

## SUMÁRIO

---

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Matriz Extracelular.....	18
1.2 Modelo de Hipertrofia Compensatória.....	20
1.3 Participação das células satélites na hipertrofia compensatória.....	21
1.4 Fotobiomodulação Local.....	23
1.5 Fotobiomodulação Vascular.....	25
JUSTIFICATIVA.....	27
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>29</b>
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos.....	29
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Animais.....	30
3.2 Grupos Experimentais.....	30
3.3 Fluxograma do estudo.....	32
3.4 Procedimento Cirúrgico.....	32
3.5 Protocolo de Fotobiomodulação Vascular.....	34
3.6 Protocolo de Fotobiomodulação Local.....	35
3.7 Análise de sensibilidade mecânica. (Teste de von Frey) .....	37
3.8 Análise Funcional da Marcha (Teste do Índice Funcional do Ciático)...	37
3.9 Procedimento de Eutanásia de Coleta do Material.....	39
3.10 Análise de relação de massa muscular.....	40
3.11 Análise quantitativa e qualitativa do tecido muscular .....	41
3.12 Análise dos resultados.....	42
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Artigo 1.</b> Fotobiomodulação vascular aumenta o diâmetro da fibra muscular e melhora os aspectos da marcha durante a hipertrofia compensatória do músculo plantar em ratos .....	43

<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>84</b>
8.1 Anexo A. Checklist.....	84
8.2 Anexo B. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Experimentação Animal.....	86

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Descrição dos mecanismos celulares e moleculares durante o processo de hipertrofia.....	22
<b>Figura 2:</b> Mecanismos moleculares de ação da FBM com laser em baixa intensidade.....	24
<b>Figura 3:</b> Fluxograma da metodologia do estudo incluindo os diferentes grupos experimentais, períodos de avaliação e análises realizadas.....	32
<b>Figura 4:</b> Descrição dos procedimentos de ablação dos músculos sinergistas (gastrocnêmio e sóleo) do músculo plantar e irradiação vascular e local utilizando a FBM com laser em baixa intensidade.....	34
<b>Figura 5:</b> Dispositivo de caminhada utilizado para a análise funcional da marcha através do índice funcional do ciático.....	38
<b>Figura 6:</b> Linha do tempo do estudo demonstrando os 4 grupos experimentais; Intervenção diária por 7 ou 14 dias com FBMV ou FBML nos grupos tratados; Análises funcionais e eutanásia realizadas ao sétimo ou décimo quarto dia do experimento.....	40
<b>Figura 7:</b> Demonstração da mensuração do espaço da área de diâmetro da fibra e da área de secção transversa da fibra muscular utilizando o programa ImageJ (NIH).....	41
<b>Figura 8:</b> Cortes histológicos transversais dos músculos plantares corados com hematoxilina e eosina (400X) dos diferentes grupos experimentais.....	58
<b>Figura 9:</b> Valores médios $\pm$ erro padrão da área de secção transversa das fibras musculares do músculo plantar durante a HC nos diferentes grupos experimentais e períodos de análise. Anova - Tukey, * $p < 0,05$ vs controle; ** $p < 0,01$ vs hipertrofia e *** $p < 0,001$ vs controle, hipertrofia e hipertrofia +FBML.....	59

<b>Figura 10:</b> Valores médios $\pm$ erro padrão da área do diâmetro das fibras musculares do músculo plantar durante a HC nos diferentes grupos experimentais e períodos de análise. Anova - Tukey, * $p < 0,05$ vs hipertrofia + FBML; *** $p < 0,001$ vs controle e vs hipertrofia.....	60
<b>Figura 11:</b> Valores médios $\pm$ erro padrão da relação de massa muscular esquerda/ direita do músculo plantar durante a HC nos diferentes grupos experimentais e períodos de análise. Anova - Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs controle.....	61
<b>Figura 12:</b> Valores médios $\pm$ erro padrão da análise de sensibilidade mecânica do músculo plantar durante a HC nos diferentes grupos experimentais e períodos de análise. Anova - Tukey, *** $p < 0,001$ vs controle.....	62
<b>Figura 13:</b> Valores médios $\pm$ erro padrão da análise funcional da marcha pelo Índice Funcional do Ciático durante a HC nos diferentes grupos experimentais e períodos de análise. Anova - Tukey, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle.....	63
<b>Figura 14:</b> Valores médios $\pm$ erro padrão da análise funcional da marcha pelo Índice Funcional do Tibial durante a HC nos diferentes grupos experimentais e períodos de análise. Anova - Tukey, * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle.....	64
<b>Figura 15:</b> Valores médios $\pm$ erro padrão da análise funcional da marcha pelo Índice Funcional do Peroneio durante a HC nos diferentes grupos experimentais e períodos de análise. Anova - Tukey, * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle.....	65
<b>Tabela 1:</b> Descrição dos parâmetros utilizados para irradiação com FBMV ou FBML.....	36



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ANOVA	Análise de Variância
AsGaAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
AST	Área de Secção Transversa
ATP	Adenosina Trifosfato
CS	Células Satélites
CCO	Citocromo C Oxidase
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FRM	Fator Regulatório Miogênico
FRM 4	Fator Regulatório Miogênico 4
FRM 5	Fator Regulatório Miogênico 5
FBM	Fotobiomodulação
FBML	Fotobiomodulação Local
FBMS	Fotobiomodulação Sistêmica
FBMV	Fotobiomodulação Vascular
FBMVT	Fotobiomodulação Vascular Transcutânea
HC	Hipertrofia Compensatória
HE	Hematoxilina e Eosina
IFC	Índice Funcional do Ciático
IFT	Índice Funcional do Tibial
IFP	Índice Funcional do Peroneo
IT	Abertura dos dedos intermediários / Intermediate toes
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL1- $\beta$	Interleucina 1 $\beta$

IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
ILIB	Intravascular Laser Irradiation of Blood
NLIB	Non-Invasive Laser Irradiation of Blood
KCL	Cloreto de Potássio
LBI	Laser de Baixa Intensidade
MEC	Matriz Extracelular
MMp-2	Metaloproteinases da Matriz do Tipo - 2
MMp-9	Metaloproteinases da Matriz do Tipo - 9
MyoD	Fator Determinante de Mioblástos
mW	MiliWatts
Nm	Nanômetros
ph	Potencial e Hidrogênio
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PL	Comprimento da pegada / Print legth
TGF- $\beta$	Fator de Transformação de Crescimento $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TS	Abertura total dos dedos / Total spread of toes
ZnCl <sub>2</sub>	Cloreto de Zinco
°C	Graus Celsius
Cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
J	Joule
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
$\mu$ m	Micrometro
G	Gramma
mg	Miligramma

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\lambda$	Comprimento de Onda
$\text{W}/\text{cm}^2$	Watts por centímetro quadrado

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

---

O músculo esquelético é um tecido dinâmico e apresenta grande capacidade adaptativa (plasticidade) sendo composto por fibras musculares e células satélites (CS) rodeadas por matriz extracelular (MEC). Este tecido é capaz de alterar suas características para atender às suas diversas demandas funcionais<sup>(1-3)</sup>.

A necessidade de adaptação neste tecido pode ocorrer frente a uma sobrecarga mecânica imposta as fibras (necessidade funcional), favorecendo o aumento da síntese proteica, promovendo assim o aumento da área transversal da fibra muscular, bem como da massa muscular<sup>(4,5)</sup>.

O aumento do tamanho da fibra, ou seja, a hipertrofia é necessária para permitir que o músculo atenda a demanda exigida para a geração de força<sup>(5)</sup>.

### 1.1 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A MEC é uma estrutura dinâmica que confere suporte e proteção ao músculo esquelético, bem como, favorece a sua função contrátil. É também responsável pela transmissão e manutenção de força para o músculo esquelético, assim sendo, a MEC pode influenciar tanto a função basal do músculo, como em sua capacidade de adaptação<sup>(6)</sup>. Além disso, por ser uma estrutura com características adaptativa, a MEC juntamente com o tecido conjuntivo é capaz de responder as demandas funcionais a que o músculo é exposto, adaptando-se funcionalmente e estruturalmente as sobrecargas mecânica que incidam sobre o tecido muscular<sup>(7)</sup>. Durante o processo de hipertrofia muscular, há a necessidade de adaptações na matriz extracelular (MEC) e o aumento do fluxo sanguíneo necessários para garantir a funcionalidade do músculo<sup>(8, 9)</sup>.

Os principais componentes da MEC são os colágenos tipo I, III e IV, além de laminina, fibronectina e proteoglicanos<sup>(10-11)</sup>, que embora sejam fundamentais para o adequado desempenho do músculo, devem ser devidamente modulados no que diz respeito à sua deposição, organização e degradação, uma vez que quando depositado em excesso ou de forma desorganizada pode comprometer a funcionalidade e as características do

tecido muscular devido ao risco de formação de tecido cicatricial (fibrose), condição fortemente associada a maiores riscos de lesão muscular, bem como com a perda da função do músculo<sup>(12-13)</sup>.

O colágeno é a principal macromolécula presente na MEC sendo sintetizada pelos fibroblastos e responsável pela estrutura da MEC do músculo esquelético<sup>(6,14)</sup>. As fibras colágenas são também as proteínas que estão intimamente ligadas com a capacidade de transmissão de força tanto para o músculo quanto para o tendão frente as deformações que podem acometer o tecido muscular<sup>(15)</sup>.

Sabe-se que diversos tipos de colágeno são expressos durante o desenvolvimento do músculo. Contudo, nas regiões do endomísio, perimísio e epimísio de músculos adultos são encontradas de forma predominante os colágenos do tipo I e III <sup>(6)</sup>.

Quanto a organização e disposição das fibras, observa-se que as fibras de colágeno se diferenciam ao longo do trajeto do músculo e podem estar organizadas em padrão paralelo ou cruzado. Essas organizações parecem estar relacionadas tanto com a carga colocada sobre o músculo quanto com a etapa de remodelação do colágeno<sup>(14,15)</sup>.

O remodelamento da MEC é um evento extremamente importante em qualquer evento que demande a síntese ou a degradação de colágeno, como nas lesões musculares agudas, treinamentos de resistência e em situações de sobrecarga muscular excessiva como ocorre na hipertrofia compensatória (HC) <sup>(13)</sup>. Nessas situações, o excesso de deposição dos componentes da MEC, pode induzir o tecido muscular a formação de tecido cicatricial tornando-o mais suscetível à novas lesões. Assim, o adequado remodelamento da MEC promoverá uma melhor organização e deposição de colágeno reduzindo os riscos de novas lesões, tendinopatias e fibrose tecidual<sup>(13)</sup>.

A degradação dos componentes excessivos da MEC se dá por intermédio de enzimas denominadas como metaloproteinases (MMPs)<sup>(11-12)</sup>. As MMPs são enzimas dependentes de zinco que participam ativamente no processo de remodelamento da MEC realizando a degradação seletiva de seus componentes<sup>(16-17)</sup>. Existem diversos tipos de MMPs, no músculo esquelético as MMPs comumente encontradas são as MMPs dos tipos 2 e 9, capazes de degradarem os colágenos do tipo IV e VII e X, facilitando assim as etapas da

miogênese muscular, bem como a angiogênese, sendo estas etapas fundamentais para o adequado desenvolvimento do músculo esquelético <sup>(11,18)</sup>.

Martinelli et al. (2020)<sup>(13)</sup>, ao avaliarem a influência da fotobiomodulação (FBM), sobre a atividade enzimática da metaloproteinases do tipo 2 da matriz (MMP-2), sobre o músculo plantar de ratos submetidos a hipertrofia compensatória (HC), observaram que tanto os animais tratados quanto os não tratados com FBM aumentaram a atividade enzimática da MMP-2 frente a sobrecarga muscular, indicando a participação dessa enzima no controle da degradação da quantidade de colágeno depositada na matriz durante a sobrecarga muscular.

## **1.2 MODELO DE HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA**

A hipertrofia compensatória (HC), é resultante de uma sobrecarga imposta ao músculo na ausência de atividade de seus sinergistas (remoção cirúrgica dos sinergistas) sendo o modelo mais utilizado para estudar esse tipo de sobrecarga <sup>(3,5,13)</sup>. Nos últimos anos, os músculos mais utilizados em modelos de HC foram o músculo sóleo e o músculo plantar (com remoção cirúrgica dos músculos gastrocnêmio medial, lateral e do músculo sóleo) e diversos autores justificam a escolha do músculo plantar pela diversidade do seu tipo de fibras e sua grande capacidade de adaptação<sup>(5,19-21)</sup>. A HC é uma adaptação necessária e de aspecto positivo, sempre que houver um comprometimento funcional da musculatura circunvizinha ou de um ou mais músculos pertencentes ao mesmo grupo muscular. Nesse sentido, a HC tem como objetivo substituir o trabalho funcional dos músculos que sofreram algum tipo de dano e por esse motivo, perderam sua capacidade funcional. Assim, para que a demanda muscular continue a ser suprida, um outro músculo com funções preservadas entrará em processo de HC para suprir a necessidade funcional dos músculos comprometidos.

Na prática clínica, a HC pode ocorrer devido às lesões nervosas parciais ou desequilíbrio que diminuam a ação dos músculos sinergistas sobrecarregando outros músculos que deverão se adaptar <sup>(13)</sup>. Tais eventos podem ocorrer por meio de acidentes automobilísticos e / ou acidentes que promovam uma ruptura de tendão, trauma muscular com esmagamento de um músculo <sup>(22)</sup>, bem como de seus nervos e doenças como a Esclerose Lateral

Amiotrófica (ELA) que promove a atrofia de algumas fibras musculares e a HC de outras. Nessa situação a HC ocorre devido ao comprometimento da miogênese causada pela desnervação<sup>(23)</sup>. Assim, indivíduos acometidos por esses tipos de alterações musculares podem evoluir com um certo grau de déficit funcional dos músculos e de seus nervos.

Em condições em que há o comprometimento da função muscular especialmente de membros inferiores, é comum ocorrer um impacto direto sobre o padrão de funcionalidade da marcha devido à fraqueza muscular. Nesse contexto, avaliar cinemática de marcha e a sensibilidade mecânica podem auxiliar na identificação e confirmação dessas alterações frente ao processo de HC, permitindo assim estabelecer novos protocolos de tratamentos que resultem na melhoria da capacidade funcional. Recentemente estudos experimentais em modelos de lesões nervosas e musculares, avaliaram esses aspectos por meio da análise funcional da marcha utilizando o índice funcional do ciático (IFC) e por meio da análise da sensibilidade mecânica utilizando o teste de von Frey (teste mecânico)<sup>(24-27)</sup>. Essas análises permitem uma avaliação adequada tanto do comprometimento funcional quanto da resposta de sensibilidade após alterações musculares e nervosas.

### **1.3 PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS SATÉLITES NA HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA**

O processo de crescimento e hipertrofia do músculo envolve a participação das células satélites (CS)<sup>(28)</sup>. Estas são células precursoras miogênica indiferenciadas que permanecem em estado quiescentes, entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras musculares<sup>(29-35)</sup>. Quando ativadas, isto é, após algum tipo de dano tecidual advindo de uma sobrecarga aguda, exercício ou ainda por algum tipo de lesão muscular, uma pequena parte dessas células retorna ao seu estado quiescente para restabelecer a população de CS, processo conhecido como auto renovação<sup>(32-33, 35)</sup>, enquanto outra parte entram em processo de proliferação, diferenciação, migração e fusão, dando origem aos mioblastos que se fundirão à uma fibra muscular adulta danificada a fim de repará-la ou formarão uma nova fibra muscular reestabelecendo assim a funcionalidade do tecido<sup>(1, 32, 33)</sup>.

A hipertrofia do músculo esquelético pode ocorrer através dos seguintes mecanismos: através de realização de exercícios excêntricos de alta intensidade ou por ativação das CS em respostas a um estímulo agudo, como no caso da ablação sinérgica de determinados músculos. Em ambos os casos, observa-se a participação das CS como mediadora desses eventos <sup>(36-38)</sup>.

Durante a HC há a necessidade de adaptação das fibras musculares no que diz respeito as mudanças em seu tamanho e crescimento, resultando em um aumento de sua área de secção transversa (AST), bem como de seu diâmetro <sup>(13)</sup>. Além disso, na HC do músculo esquelético podem ocorrer lesões no tecido por conta da sobrecarga imposta sobre o músculo, bem como em decorrência da própria ablação sinérgica a fim de que o músculo sofra uma sobrecarga funcional<sup>(39)</sup>. Nessas situações, a ativação das CS é fundamental tanto para o reparo das fibras frente as microlesões próprias do miotrauma adaptativo, quanto para o controle de crescimento e aumento das fibras musculares<sup>(39, 40)</sup>.

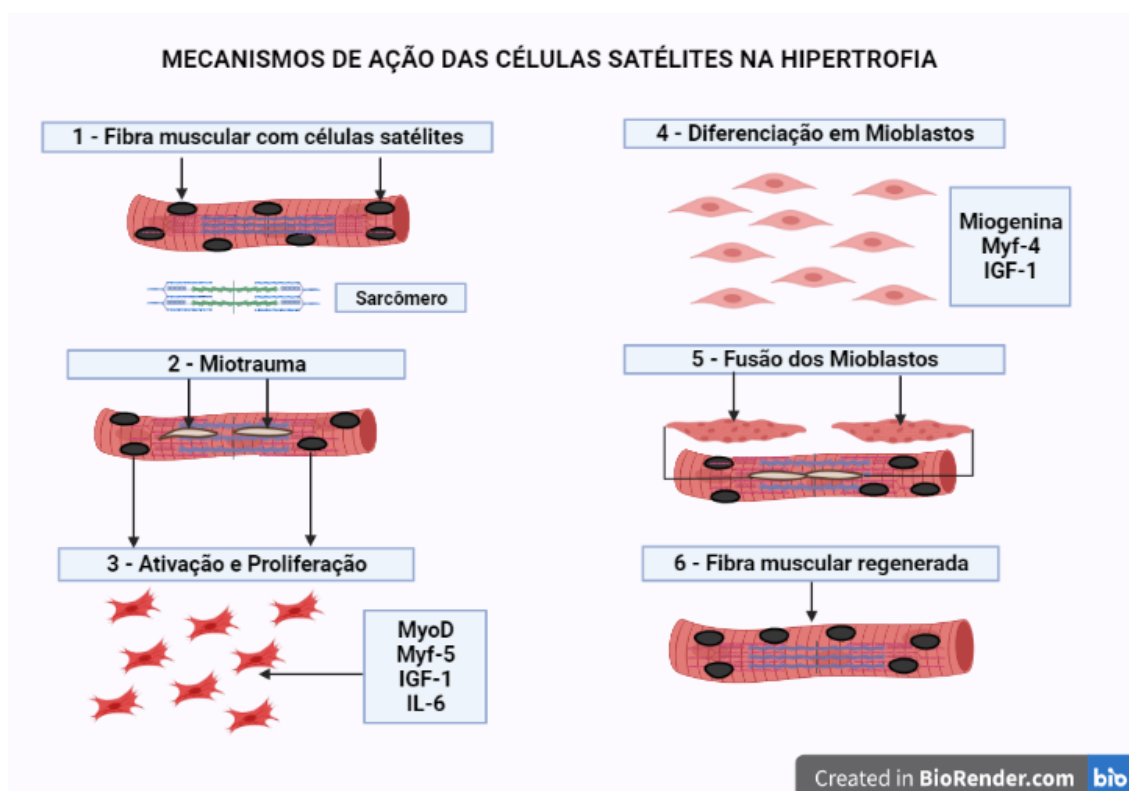


Figura 1: Esquema representativo da adaptação muscular após um miotrauma.

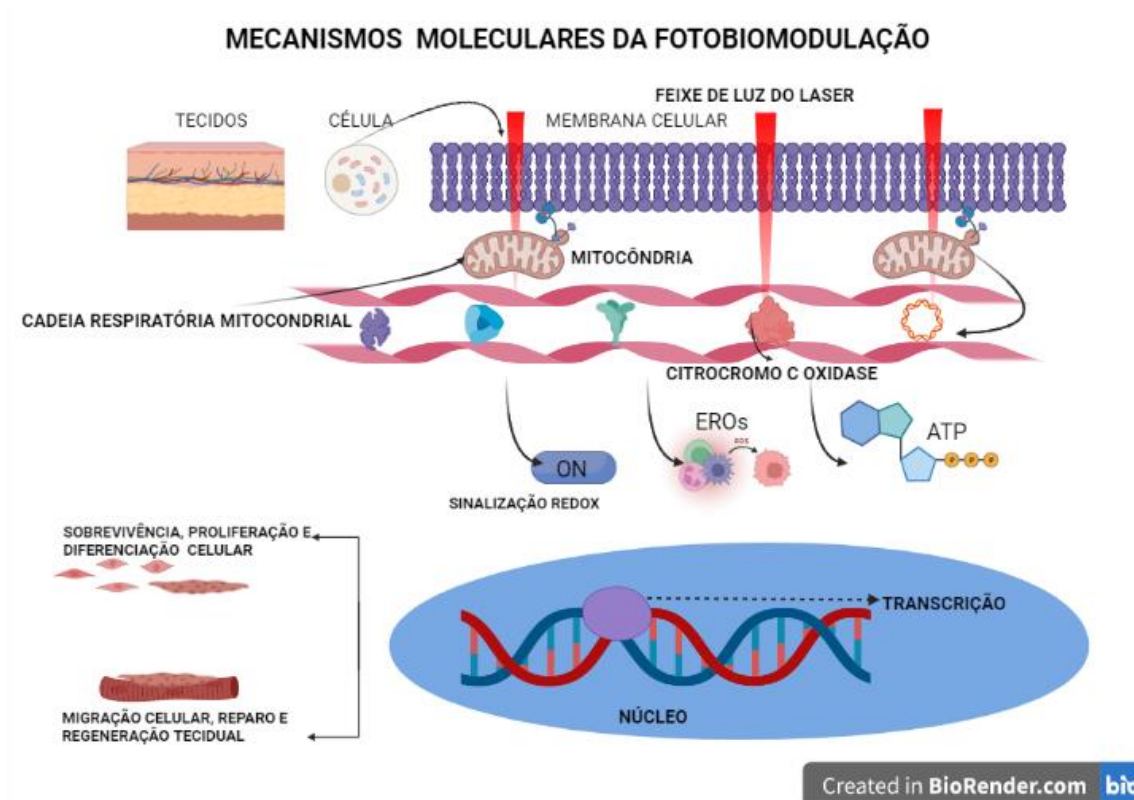
Fonte: Adaptado de Aguiar AF e Aguiar DH (2009)<sup>(41)</sup>, desenvolvida em Biorender (<https://biorender.com/>).



(1) . Fibra muscular saudável com células satélites em estado quiescente. (2). Representação de dano na fibra após um miotrauma. (3). Células satélites ativadas e em proliferação. (4). Células satélites diferenciando-se em mioblastos. (5). Migração, alinhamento e fusão dos mioblastos ao local do miotrauma severo (necrose), a fim de formar uma nova fibra. No miotrauma adaptativo (excesso de sobrecarga), ocorrerá a migração e fusão dos mioblastos à fibra pré-existente promovendo o reparo das microlesões da fibra danificada e/ou para adicionar mionúcleos favorecendo a síntese proteica e consequentemente a hipertrofia da fibra muscular. (6). Fibra muscular regenerada com célula satélite quiescente apta a exercer suas funções.

#### **1.4 FOTOBIMODULAÇÃO LOCAL (FBML)**

A fotobiomodulação (FBM) tem sido amplamente utilizada como um recurso terapêutico frente as alterações musculoesqueléticas, conforme já descrito na literatura<sup>(3, 10-14, 25)</sup>. O efeito da irradiação do laser em baixa intensidade (LBI) nos tecidos, ocorre por meio da absorção da luz, pelos fotorreceptores (cromóforos) presentes nas células, em especial a enzima citocromo C oxidase (CCO), estes fotorreceptores podem modular as reações bioquímicas e fotoquímicas nas células, resultando na transferência de elétrons da cadeia respiratória, induzindo a síntese de adenosina trifosfato (ATP), esse processo é denominado como cadeia respiratória mitocondrial<sup>(42)</sup>.



**Figura 2: Mecanismo de ação da FBM com laser em baixa intensidade (LBI):** O feixe de luz atravessa a membrana celular sendo absorvido pelos cromóforos contidos na cadeia respiratória mitocondrial. Em sequência inicia-se uma cascata de eventos que podem incluir a liberação de óxido nítrico (NO), a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP). Esses mediadores podem ativar os fatores de transcrição relacionados com a sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração celular, bem como com o reparo ou regeneração tecidual.

**Fonte:** Adaptado de Avci P (2013)<sup>(43)</sup>, desenvolvida em Biorender (<https://biorender.com/>).

Uma grande ênfase tem sido dada à terapia com FBM aplicada de forma local devido à sua capacidade de atuar sobre os tecidos promovendo a regeneração e a proliferação celular. A aplicação local da FBM, é realizada diretamente sobre um tecido alvo e a área a ser irradiada deve ser delimitada, a fim de garantir que a absorção da luz e seus efeitos, sejam limitados apenas a área específica de tratamento.

Dentre os efeitos positivos da FBM aplicada de forma local no tecido muscular, encontram-se a modulação da resposta inflamatória, a síntese e produção de colágeno<sup>(10-11,14)</sup> e o remodelamento da matriz extracelular MEC<sup>(12)</sup>, além de apresentar efeitos positivos sobre os fatores regulatórios miogênicos<sup>(44)</sup> e sobre a angiogênese após lesão muscular aguda<sup>(10)</sup>. Mesquita-Ferrari et al. (2011)<sup>(45)</sup>, ao utilizar a fotobiomodulação local (FBML) após lesão aguda em tecido muscular, verificaram uma modulação na expressão das citocinas TNF- $\alpha$  após 1 e 7 dias e TGF- $\beta$  após 7 dias.

Com relação a HC Martinelli et al. (2020)<sup>(13)</sup> demonstraram que a FBML ( $\lambda$  780nm, 1W/cm<sup>2</sup>, 3,2 J, 80s), promoveu a modulação de citocinas envolvidas no aumento da massa muscular, incluindo as citocinas interleucina seis (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). No estudo de Terena et al. (2015)<sup>(3)</sup>, avaliou-se o efeito da FBML ( $\lambda$  780nm, 1W/cm<sup>2</sup>, 3,2 J, 80s), sobre os aspectos morfológicos do músculo plantar durante a HC e verificou-se um aumento na AST das fibras musculares após 14 dias. Além disso, Terena et al. (2018)<sup>(14)</sup> usando a FBML ( $\lambda$  780nm, 1W/cm<sup>2</sup>, 3,2 J, 80s), observaram aumento no número de mionúcleos após 14 dias, aumento do colágeno no grupo irradiado após 7 dias e uma diminuição após 14 dias e melhor organização das fibras colágenas nos tendões após 7 dias.

## 1.5 FOTOBIMODULAÇÃO VASCULAR

Outra modalidade de FBM que tem demonstrado bons resultados como recurso terapêutico é a fotobiomodulação vascular (FBMV) transcutânea não invasiva, sendo realizada sobre a região de grandes vasos sanguíneos de forma a induzir uma modulação sistêmica sem necessidade de determinação da área a ser tratada e abrangendo áreas maiores. Esta forma de irradiação deriva da técnica de ILIB que caracteriza a Irradiação Intravascular do Sangue com Laser ou (*Intravascular Laser Irradiation of blood- ILIB*)<sup>(46)</sup>.

A técnica de ILIB foi desenvolvida por volta de 1980 e consiste na irradiação intravascular com laser de baixa intensidade (LBI) aplicada na corrente sanguínea por meio das artérias e veias promovendo a ativação celular<sup>(47)</sup>. O ILIB pode agir sobre o sistema imunológico, sobre os hormônios e promover a melhora do sistema vascular, bem como de outros sistemas do organismo diminuindo assim os riscos de doenças vasculares e indiretamente

a redução de doenças em outros órgãos de forma sistêmica<sup>(48)</sup>. Por ser capaz de atuar em células sanguíneas, nos hormônios e sistema imunológico o ILIB pode influenciar todos os outros sistemas de um organismo<sup>(48)</sup>. Ao longo dos anos, esta técnica foi aprimorada e a irradiação que anteriormente era realizada de forma intravascular (ILIB), passou a ser aplicada de maneira transcutânea sendo denominada de irradiação do sangue não invasiva (*non-invasive laser irradiation of blood - NLIB*) ou fotobiomodulação sistêmica (FBMS)<sup>(49)</sup>. Recentemente um novo termo que vem sendo utilizado para referir essa mesma técnica é o termo Fotobiomodulação Vascular (FBMV)<sup>(46)</sup>.

Lopez et al. 2021<sup>(50)</sup> avaliaram o efeito da FBMV ( $\lambda$  780nm, 1 W/cm<sup>2</sup>, 80 J/cm<sup>2</sup>, 3,2J) com um ponto de aplicação, sobre a veia caudal de ratos Wistar, durante 80s em um modelo de lesão muscular e encontraram um efeito positivo dessa terapia sobre o edema, mionecrose, infiltrado inflamatório, neoformação de fibras musculares e sobre os marcadores bioquímicos presentes em situações de lesões musculares agudas.

Ramos et al. (2018)<sup>(51)</sup> utilizando a FBMV (660nm, 100mW/cm<sup>2</sup>, 6,426 J), aplicada na região da artéria auricular de ratos Wistar em um processo inicial de cicatrização de feridas na pele do dorso dos animais, demonstraram uma redução na área da ferida após uma única aplicação de 15 minutos, além de uma melhor deposição das fibras de colágeno nos animais tratados com FBMV.

Um estudo experimental usando a FBMV com os parâmetros de ( $\lambda$  650nm, 100mW, 45 J/cm<sup>2</sup>, por 30 minutos, sendo aplicada duas vezes ao dia, 6 dias por semana, durante 20 semanas, na artéria auricular de coelhos hipercolesterolêmicos demonstrou efeitos positivos como a melhora da microcirculação e redução dos níveis lipídicos do sangue<sup>(52)</sup>.

Kilik et al. (2019)<sup>(53)</sup> realizaram um estudo proteômico do plasma sanguíneo de ratos Wistar irradiados na área do coração (artérias coronárias) utilizando a FBMV infravermelha de forma transcutânea e verificaram que a FBMV promoveu um aumento quantitativo das proteínas (haptoglobina, hemopexina e fibrinogênio gama). Os autores correlacionam o aumento encontrado dessas proteínas no sangue dos animais irradiados a um efeito protetor da FBMS contra o estresse oxidativo e seus danos no organismo.

Estudos clínicos também demonstram efeitos positivos da FBMV em vários aspectos<sup>(54-56)</sup>. Um estudo clínico utilizando a FBMV infravermelha ( $\lambda$

808nm, 100 mW/cm<sup>2</sup>, e energia 9 J/cm<sup>2</sup>), com uma única aplicação por técnica intravascular após o processo de angioplastia, demonstraram reduções nos níveis de interleucinas pró-inflamatórias (IL1-β e IL-6) e aumento do nível de IL-10<sup>(54)</sup>.

Outro estudo clínico utilizando a FBMV no espectro vermelho (λ 632nm, 4mW e energia de 14,4 J), por 1 hora, durante 15 dias, por técnica intravascular em pacientes com lesão medular crônica, demonstrou um aumento no número de cópias de DNA mitocondrial dos leucócitos, aumento da síntese de ATP e da capacidade antioxidante total do sangue além de diminuir o malondialdeído (MDA) que é um subproduto da oxidação lipídica e biomarcador do estresse oxidativo. Os autores relataram que juntos esses dados sugerem uma resposta positiva da FBMV sistêmica na disfunção mitocondrial e no alívio do estresse oxidativo nos pacientes com lesão medular crônica<sup>(55)</sup>.

No estudo de Kazemikhoo et al. (2016)<sup>(56)</sup> foram demonstrados efeitos positivos da FBMV intravenosa (630nm, potência de 1,5 mW, tamanho do ponto de 0,01cm<sup>2</sup>, modo contínuo), por 30 minutos sobre o metabolismo de indivíduos diabéticos, como a redução de arginina, cuja redução pode promover a ativação de óxido nítrico, induzindo o relaxamento do endotélio vascular liso. Os autores observaram também uma redução na expressão do receptor do fator de crescimento endotelial (RFCE), associando esse achado à uma melhora no quadro de neuropatia e de seus danos secundários em pacientes com diabetes tipo 2.

## **JUSTIFICATIVA**

Clinicamente a HC é causada por lesões nervosas parciais e/ou por desequilíbrios que diminuem a ação dos músculos sinergistas, aumentando a sobrecarga em outros músculos que deverão se adaptar. Apesar do estudo de Martinelli et al. (2020)<sup>(13)</sup> e Terena et al. (2018)<sup>(14)</sup> terem demonstrado efeitos positivos da FBM durante o processo de HC, estes efeitos se referem apenas a aplicação local, não havendo relatos sobre seus efeitos quando aplicado sistemicamente ou de forma vascular transcutânea (FBMV) e as comparações com a aplicação local (FBML) sobre a resposta morfológica e funcional do

tecido muscular durante o processo de HC, incluindo aspectos como sensibilidade mecânica, capacidade funcional e marcha.

Outro ponto não encontrado na literatura, diz respeito aos efeitos comparativos da utilização da FBM quando aplicado de forma vascular e de forma local sobre os aspectos morfológicos do músculo plantar após a HC, incluindo aspectos como a AST e o diâmetro da fibra. Portanto, a compreensão de como a FBMV e a FBML podem interferir sobre esses aspectos, bem como comparar os efeitos desses dois tipos de terapia, nos permite ampliar o entendimento de ação desses recursos terapêuticos, possibilitando estabelecer novos protocolos de tratamento que resultem em melhoria funcional durante a HC por sobrecarga.

A principal diferença entre essas duas formas de aplicação da FBM é que a FBML, se restringe à aplicação pontual sobre uma área específica de que deve ser devidamente determinada para que o efeito ocorra diretamente no tecido alvo, enquanto a FBMV é aplicada sobre um grande vaso, em um único ponto, sendo realizada sem a necessidade de delimitar uma área específica de tratamento. Além disso, a aplicação da FBMV assim como a FBML também é realizada de forma não invasiva e permite a realização do protocolo sem a necessidade de determinar a área local do tratamento, promovendo uma modulação dos tecidos envolvidos na adaptação da HC de forma mais ampla uma vez que a aplicação será sobre as células sanguíneas (hemácias e leucócitos periféricos).

Como hipótese, tanto o tratamento com FBMV quanto com FBML, poderão modular o processo de HC interferindo nos aspectos da sensibilidade mecânica e nos aspectos da capacidade funcional do músculo plantar. Além disso, a FBMV e a FBML poderão modular fatores de crescimento, citocinas e processos celulares que podem determinar alterações morfológicas no músculo plantar de ratos, favorecendo o aumento da massa muscular e a capacidade de adaptação desse tecido frente a HC, bem como contribuindo com a funcionalidade da marcha reduzindo o déficit funcional dos músculos envolvidos no processo de HC, sendo estes aspectos extremamente importantes e necessário à um músculo sobrecarregado.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Geral

- Avaliar de forma comparativa os efeitos da FBM vascular e local sobre os aspectos morfológicos e funcionais do tecido muscular durante o processo de hipertrofia compensatória do músculo plantar em ratos.

### 2.2. Específicos:

- Comparar os efeitos da FBMV ou FBML aplicadas por 7 e 14 dias durante o processo de HC no que diz respeito a:
  - Aspectos morfológicos das fibras musculares incluindo área de secção transversa (AST) e diâmetro das fibras.
  - Avaliação do grau de hipertrofia pela relação de massa muscular Direito/Esquerdo.
  - Sensibilidade mecânica das patas traseiras nos animais utilizando o teste de von Frey.
  - Capacidade funcional dos membros posteriores dos animais utilizando o índice funcional do ciático (IFC).

### 3. METODOLOGIA

---

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e protocolada sob o CEUA nº 4624150520 e os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 35 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*: var. Albinus, Rodentia, Mammalia), com idade de 2 meses e peso médio entre +/-250g até +/-280g, mantidos no biotério da UNINOVE em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente de 22°C, umidade relativa de 40%, luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro) e comida (NUTRILAB CR-1®) e água *ad libitum*.

Os animais de cada um dos grupos foram mantidos em caixas plásticas distintas e devidamente identificadas de acordo com o nome do grupo a que pertenciam a fim de evitar confusão entre os grupos.

Não houve necessidade de exclusão de nenhum animal de qualquer um dos grupos experimentais.

#### 3.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

**1. Grupo controle:** Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico ou a irradiação com LBI. Os animais foram eutanasiados ao sétimo ou décimo quarto dia após o início dos experimentos dos outros grupos (n=5).

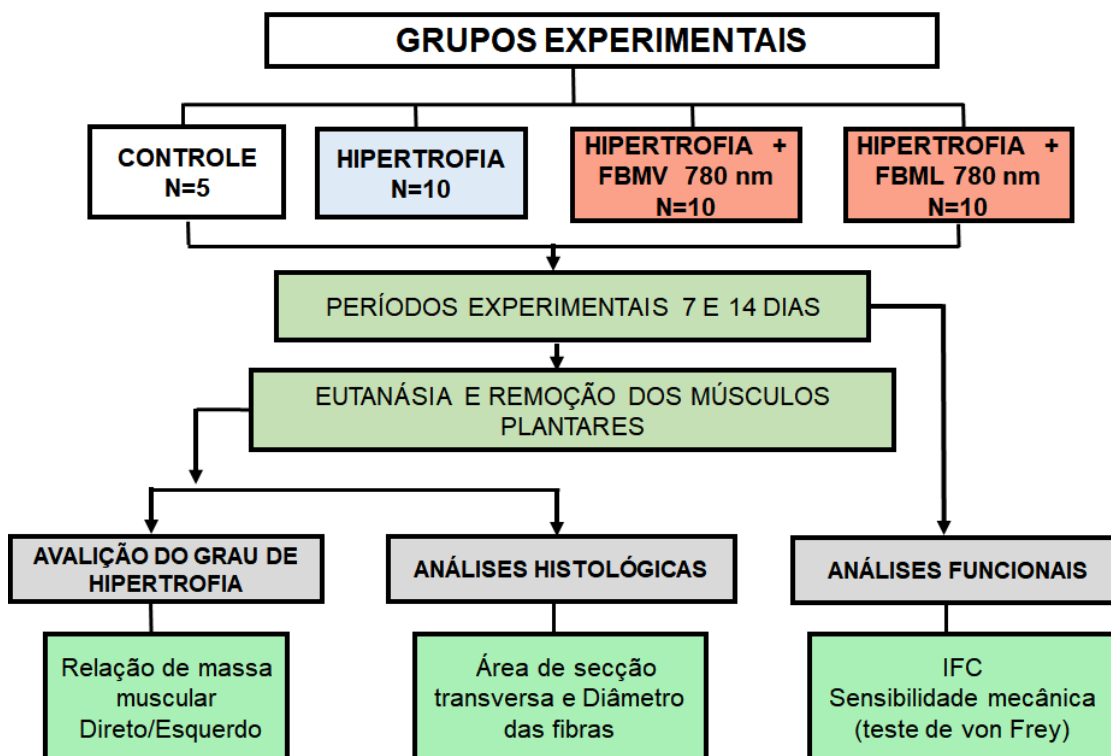
**2. Grupo Hipertrofia (H):** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas (gastrocnêmio e sóleo) do músculo plantar. Não foram submetidos a FBM e foram eutanasiados após 7 e 14 dias do início do experimento (n=10).



**3. Grupo Hipertrofia + Fotobiomodulação Local (H+FBML):** Os animais foram submetidos à ablação dos sinergistas do músculo plantar e neste grupo foi realizada a irradiação com FBML na região do músculo plantar. Os animais foram eutanasiados após 7 e 14 dias do início do experimento (n=10).

**4. Grupo Hipertrofia + Fotobiomodulação Vascular (H+FBMV):** Os animais foram submetidos à ablação dos sinergistas do músculo plantar e neste grupo foi realizada a irradiação com FBMV. Nesse grupo a irradiação foi realizada na região do dorso da cauda dos animais. Os animais foram eutanasiados após 7 e 14 dias do início do experimento (n=10).

### 3.3 FLUXOGRAMA DO ESTUDO



**Figura 3:** Fluxograma da metodologia de estudo incluindo os diferentes grupos, períodos experimentais e análises realizadas.

### 3.4 Procedimento cirúrgico

O modelo de hipertrofia utilizado no presente estudo consiste na remoção cirúrgica dos músculos sinergistas do músculo plantar, impondo uma sobrecarga de trabalho funcional sobre esse músculo. Esta técnica cirúrgica foi utilizada por Mc Carthy et al. 2011<sup>(57)</sup> e também foi descrita e utilizada por Terena et al. (2017)<sup>(5)</sup> e Martinelli A et al. (2020)<sup>(13)</sup>. No presente estudo foi realizada a remoção unilateral dos músculos sinergistas (somente pata esquerda).

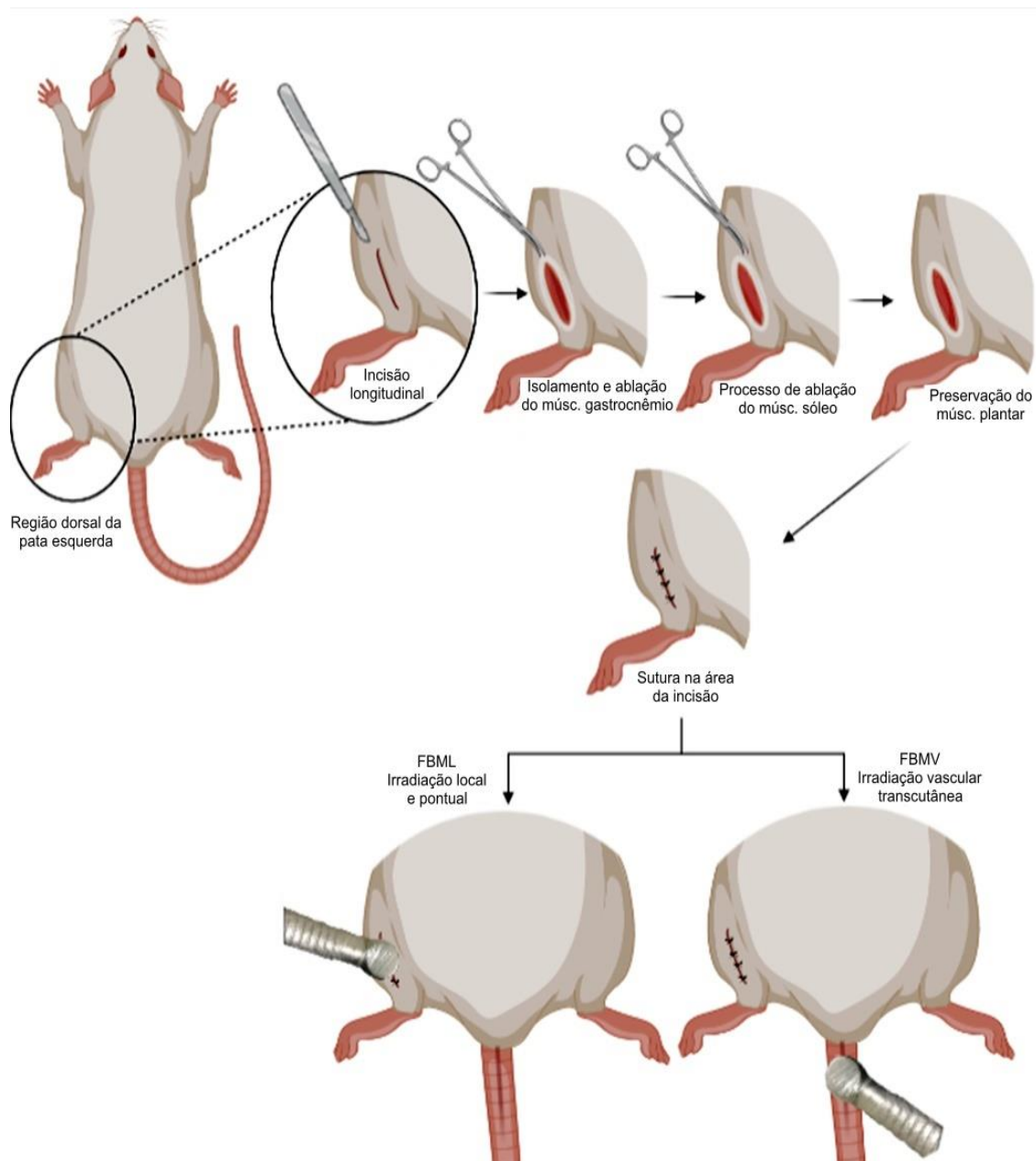
Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal a base de Ketamina 10% (0,2/100g do animal) e Xilazina 2% (0,1/100g do animal). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas de modelo insulina. Em seguida foi realizada a tricotomia seguida da incisão longitudinal na região dorsal da pata traseira de  $\pm$  2cm e exposição do músculo gastrocnêmio. Esses tendões foram isolados e seccionados para permitir a

remoção parcial do músculo. O mesmo procedimento foi realizado para o músculo sóleo, com cuidado para não causar lesões em nervos e vasos sanguíneos (Figura 4). O músculo plantar situado abaixo dos músculos removidos foi preservado e recebeu a sobrecarga funcional.

Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (espessura 5.0; (Procure)).

A superfície ocular de cada animal foi lubrificada com gaze embebida em soro fisiológico (NaCl 0,9%) para evitar o ressecamento ocular, os animais foram acomodados em caixas plásticas sobre colchonete aquecido (36-37 °C) para evitar hipotermia e ficaram sob observação até estarem livres do efeito dos anestésicos.

Com o objetivo de diminuir a sensibilidade dolorosa no pós-operatório os animais receberam administração subcutânea de analgésico dipirona 50 mg/kg e Tramadol 5 mg/kg (Cloridrato de tramadol a 2%) a cada 8 horas, durante 3 dias.



**Figura 4:** Procedimento cirúrgico de ablação dos músculos sinergistas (gastrocnêmio e sóleo), para indução da HC do músculo plantar, demonstrando na sequência a incisão na região cirúrgica, exposição e secção do músculo gastrocnêmio lateral e medial, exposição e secção do músculo sóleo, músculo plantar preservado após a retirada dos seus sinergistas, sutura na área de incisão e área irradiada com FBM de forma local ou vascular. **Fonte do próprio autor, desenvolvida no Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>)**

### 3.5 Protocolo de Fotobiomodulação Vascular (FBMV)

Imediatamente após a cirurgia, e em todos os dias do período experimental (7 ou 14 dias), os animais foram irradiados com um LBI (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil) aplicado sobre a cauda do animal sobre a região da veia caudal com os parâmetros descritos na tabela 1, de acordo com o descrito por Martinelli A et al. (2020)<sup>(13)</sup> e Terena et al.(2018)<sup>(14)</sup>. A dosimetria de ( $\lambda = 780$  nm, potência de saída média 40mW, área do feixe de 0,04 cm<sup>2</sup>, dose 80 J/cm<sup>2</sup>, por 80 segundos em um único ponto, 3,2 J), também foi baseada nos parâmetros descritos por Alves et al. (2014)<sup>(10)</sup>, Mesquita e Ferrari et al. (2011)<sup>(45)</sup> e por Lopes et al.(2021)<sup>(50)</sup> que utilizou a FBMV infravermelha aplicada em um único ponto sobre a cauda de ratos em um modelo de lesão muscular. Para o procedimento de irradiação, os animais foram contidos manualmente e a aplicação foi realizada diariamente por técnica pontual, sendo um único ponto diretamente sobre a pele do dorso da cauda dos animais submetidos a HC do músculo plantar (Roshchina et al. (2003); Yamaikina et al. (2012); Tomimura et al. (2014); da Silva et al. (2020))<sup>(58-61)</sup>. Para evitar refração do feixe o laser foi aplicado em um ângulo de 90° entre o emissor e a pele do animal. Em ambas as irradiações a potência de emissão da luz do laser foi aferida utilizando o “LaserCheck power meter” (MM Optics – São Carlos – SP – Brasil).

### **3.6 Protocolo de Fotobiomodulação Local (FBML)**

Imediatamente após a cirurgia, e em todos os dias do experimento (7 ou 14 dias), os animais foram irradiados com LBI (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil), com os seguintes parâmetros de acordo com o descrito por Terena et al. (2018)<sup>(14)</sup> e Martinelli et al. (2020)<sup>(13)</sup> ( $\lambda = 780$  nm, potência de saída média 40 mW, área do feixe de 0,04 cm<sup>2</sup>, dose de 10J/cm<sup>2</sup> por ponto, por 10 segundos cada ponto, energia total: 3,2J). A dosimetria também foi baseada nos parâmetros descritos por Alves et al. (2014)<sup>(10)</sup> e Mesquita e Ferrari et al. (2011)<sup>(45)</sup>. Os parâmetros da irradiação utilizados estão descritos na tabela 1. A irradiação foi unilateral (pata esquerda). Para o procedimento de irradiação os animais foram contidos manualmente, e a aplicação foi feita por técnica pontual, diretamente sobre a pele que recobre o músculo plantar na região da incisão e ao redor da área, sendo oito pontos de irradiação (Martinelli A et al.

(2020)<sup>(13)</sup> e Terena et al. (2018)<sup>(14)</sup>. Para evitar refração do feixe o laser foi aplicado em um ângulo de 90° entre o emissor e a pele do animal (Figura 3). A potência de emissão da luz do laser foi aferida utilizando o “LaserCheck power meter” (MM Optics – São Carlos – SP – Brasil)

Tabela 1: Parâmetros utilizados para a FBM local e vascular utilizando o LBI durante o processo de hipertrofia compensatória.

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAL)	
	Local	Vascular
<b>Modo de Aplicação</b>	Local	Vascular
<b>Local da irradiação</b>	Pata esquerda	Dorso da cauda
<b>Comprimento de onda</b>	780nm	780nm
<b>Frequência do Laser</b>	Contínuo	Contínuo
<b>Área do feixe</b>	0,04 cm <sup>2</sup>	0,04 cm <sup>2</sup>
<b>Potência média</b>	40 mW	40 mW
<b>Irradiância na Abertura</b>	1W/cm <sup>2</sup>	1W/cm <sup>2</sup>
<b>Exposição Irradiante</b>	10 J/cm <sup>2</sup>	80 J/cm <sup>2</sup>
<b>Energia por Ponto</b>	0,4 J	10 J
<b>Total de pontos</b>	8	1
<b>Tempo por Ponto</b>	10 segundos	80 segundos
<b>Tempo total De exposição</b>	80 segundos	80 segundos
<b>Energia total</b>	3,2 J	3,2 J

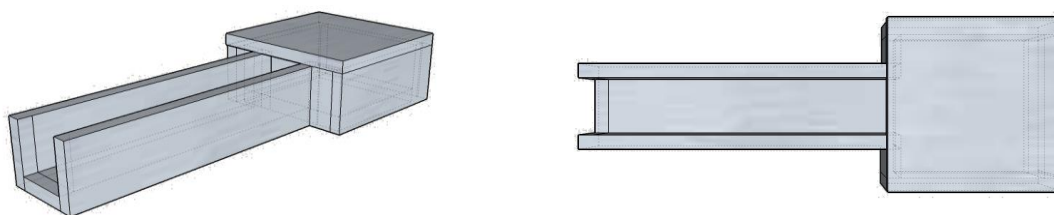
### **3.7 Análise de sensibilidade mecânica (Teste de von Frey)**

A avaliação foi realizada ao sétimo ou décimo quarto dia após a indução da HC, utilizando-se um analgesímetro digital (INSIGHT®Ribeirão Preto/SP, Brasil). O teste consistiu em avaliar a sensibilidade mecânica através do aumento da pressão nas patas traseiras, por meio de um transdutor com capacidade de 0,1-1000g e tempo de reação de 1ms, conectado a um contador de força digital expresso em gramas (Takasaki et al. (2000)<sup>(24)</sup> e Andreo L et al. (2019)<sup>(25)</sup>). Os animais foram acomodados em caixas de acrílico, o piso da caixa foi constituído por uma malha confeccionada com arame não maleável de 1mm de espessura que permitiu o acesso à superfície plantar das patas traseiras. Nos três dias que antecederem a coleta dos dados do teste de sensibilidade mecânica, os animais foram habituados por uma hora no mesmo ambiente sem nenhum tipo de interrupção sonora que interferisse na realização do teste, com o intuito de adaptá-los ao ambiente. O contato do transdutor com a superfície plantar foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno de 0,5 mm de diâmetro acoplada à ponta do transdutor, o investigador aplicou uma força linearmente crescente no centro das plantas das patas esquerdas dos ratos através dos espaços da malha, até que o animal reproduzisse uma resposta de retirada da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por 3 vezes e a média aritmética da resposta de retirada foi obtida a partir das três medidas. Para essa análise foram coletados os dados de 5 animais por grupo. Os resultados do teste foram representados em grama.

### **3.8 Análise Funcional da marcha**

Para a análise funcional de marcha ao sétimo ou décimo quarto dia do experimento foi utilizado o teste de Índice Funcional Ciático (IFC) (De Medinaceli et al. (1982)<sup>(26)</sup> e Bain et al. (1989)<sup>(27)</sup>), a mesma análise também foi descrita e utilizada por Andreo et al. (2019)<sup>(25)</sup>. Para obtenção das pegadas, as patas dos animais foram mergulhadas em tinta, deixando a cor azul impressa nas tiras de sulfite presente no percurso da passarela que os animais caminharam. Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram treinados a caminhar em um dispositivo contendo uma passarela com as laterais fechadas e um abrigo escuro e coberto ao final de seu

percurso (De Medinaceli et al. (1982)<sup>(26)</sup> e Andreo L et al. (2019)<sup>(25)</sup>). Os dados do teste contendo as impressões das patas foram digitalizadas e analisadas de acordo com os parâmetros sugeridos por Bain et al. (1989)<sup>(27)</sup> e Andreo et al. (2019)<sup>(25)</sup>.



**Figura 5:** Dispositivo de caminhada utilizado para a análise funcional da marcha.

Para essa análise foram coletados os dados de 5 animais por grupo. Os dados do teste contendo as impressões das patas foram digitalizadas e analisadas de acordo com os parâmetros sugeridos por Bain et al. (1989)<sup>(27)</sup> e Andreo et al. (2019)<sup>(25)</sup> conforme descritos a seguir: comprimento da pegada (PL, ou print length), abertura total dos dedos (do 1° ao 5° dedo – TS ou total spread of toes) e abertura dos dedos intermediários (do 2° ao 4° dedo IT ou intermediate toes).

O IFC foi calculado a partir da fórmula:

$$IFC = -38,3 \times \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109,5 \times \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13,3 \times \left( \frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

$$IFT = -37,2 \times \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 104,4 \times \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 45,6 \times \left( \frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

$$IFP = -174,9 \times \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 80,3 \times \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 13,4$$



Sendo:

E: experimental

N: normal

PL: comprimento da pegada

TS: distância entre o 1º e o 5º dedo

IT: distância entre o 2º e 4º dedo

IFC: Índice Funcional do Ciático

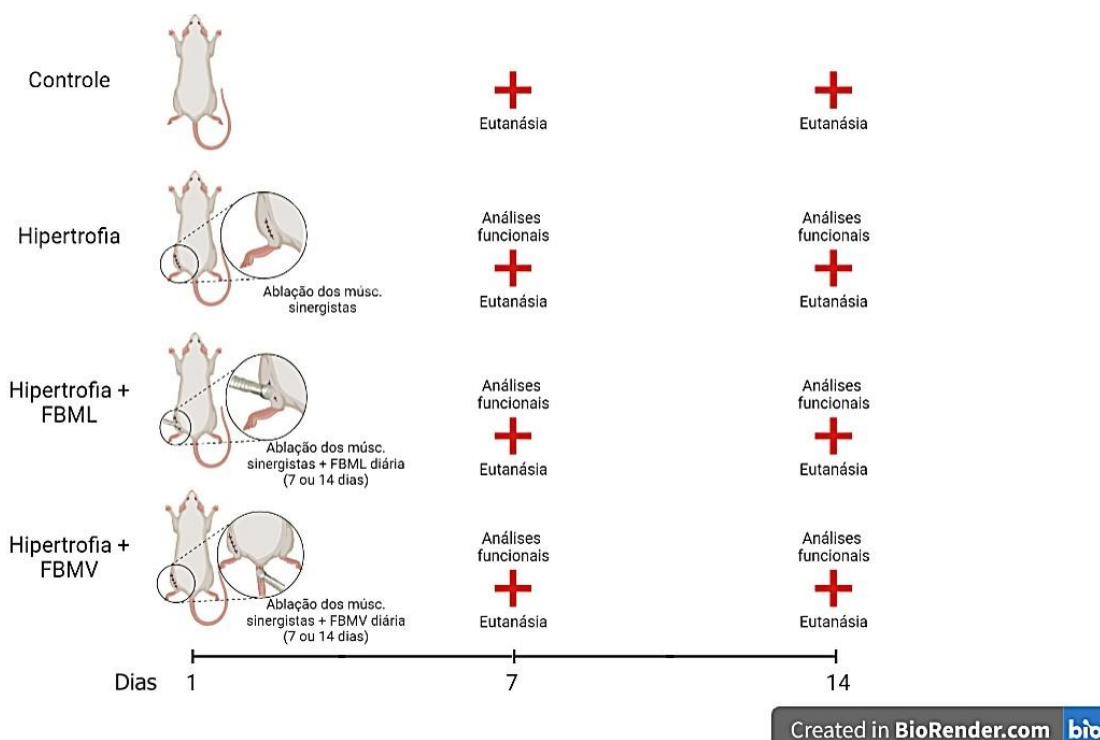
IFT: Índice Funcional do Tibial

IFP: Índice Funcional do Peroneio (fibular)

Os valores próximos de zero correspondem à função normal, enquanto o aumento na negatividade do teste, indica maior disfunção, sendo o valor -100 representativo de máxima disfunção (Bain et al. 1989)<sup>(27)</sup>.

### **3.9 Procedimento de eutanásia e coleta do material**

Ao término do período experimental de cada grupo (7 e 14 dias), os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (2x a dose aplicada para anestesia), ketamina (240 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). Os músculos plantares foram retirados, pesados em balança de precisão e utilizados para as análises da relação da massa muscular (D/E) e para análise histológicas, incluindo coloração por hematoxilina e eosina (HE).



**Figura 6:** Linha do tempo do estudo demonstrando os 4 grupos experimentais; Intervenção diária por 7 ou 14 dias com FBMV ou FBML nos grupos tratados; Análises funcionais e eutanásia realizadas ao sétimo ou décimo quarto dia do experimento.

Fonte do próprio autor, desenvolvida no Biorender (<https://biorender.com/>)

### 3.10 Análise da relação de massa muscular

Após a eutanásia dos animais nos diferentes períodos de avaliação, os músculos plantares direito e esquerdo foram cuidadosamente removidos por corte do tendão e inserção óssea e limpos conforme descrito por Shen et al. (2013)<sup>(62)</sup>. Os músculos foram pesados em uma balança semianalítica utilizando-se o peso úmido dos músculos e a massa muscular foi calculada para cada animal usando a seguinte fórmula, conforme descrito por Shen et al. (2013)<sup>(62)</sup>:

$$r = \frac{E}{D}$$

no qual

r: razão de massa muscular

E: massa do músculo esquerdo (músculo submetido a HC)

D: massa do músculo direito (músculo não submetido a HC)

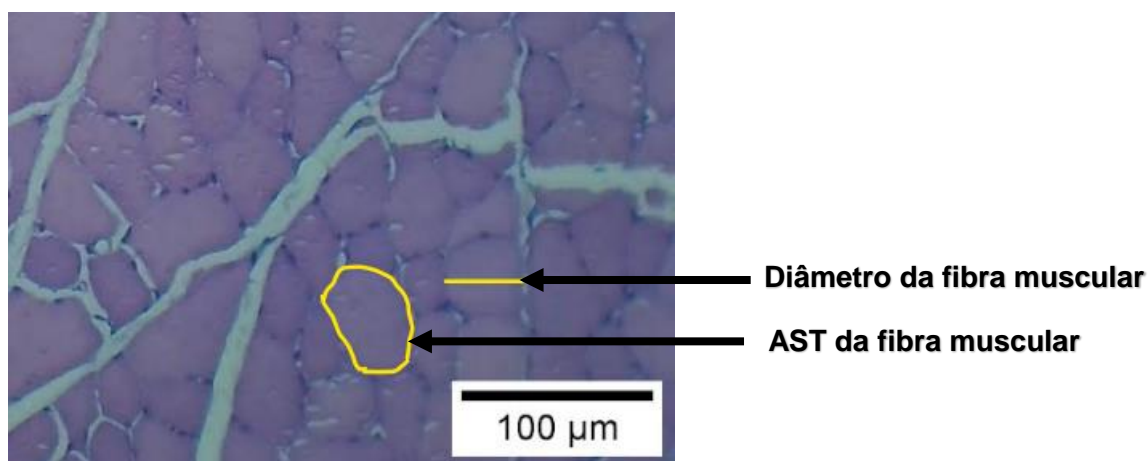
Para essa análise foram coletados os dados de 5 animais por grupo.

### 3.11 Análise qualitativa e quantitativa do tecido muscular

As amostras foram fixadas e mantidas em temperatura ambiente em formol tamponado a 10% (pH 7,4).

Em seguida, foi realizada a desidratação do material por meio de incubações em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 1h cada, imersas três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol (Reagen). As amostras foram incubadas por 12h a 60°C em parafina (paraplast, Sigma, USA) e incluídas transversalmente com as porções centrais posicionadas mais externamente no bloco. Cortes de 10µm de espessura foram obtidos utilizando o micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha) sendo transferidos em lâminas de microscopia e mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas.

As lâminas foram submetidas às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas por microscopia de luz (microscópio Axioplan 2, Zeiss, Alemanha), sendo avaliados os seguintes aspectos morfológicos: Diâmetro e área de secção transversa (AST) das fibras musculares.



**Figura 7:** Demonstração da mensuração do espaço da área de diâmetro da fibra e da área de secção transversa (AST) da fibra muscular utilizando o programa ImageJ (NIH).

Para permitir a análise quantitativa destes aspectos foram consideradas 3 áreas por lâmina de 3 animais/grupo. 100 fibras foram medidas em cada área para análise do diâmetro e da AST das fibras. Esses campos foram fotografados utilizando um microscópio de luz convencional (Zeiss Axioplan2, Alemanha) com aumento final de 400X, para permitir a contagem dos aspectos descritos.

A análise foi realizada através do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA) e os dados foram submetidos à análise estatística.

### **3.12. Análise dos resultados**

Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e foram expressos em média e desvio-padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pela ANOVA (dados paramétricos). O Teste de contraste (Pós-Hoc) utilizado foi o Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes se  $p \leq 0,05$  e foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 5.00 (California, EUA)

## 4. RESULTADOS

---

### 4.1. Artigo 1

**Fotobiomodulação vascular aumenta o diâmetro da fibra muscular e melhora os aspectos da marcha durante a hipertrofia compensatória do músculo plantar em ratos**

Martinelli A<sup>1</sup>, Andreo L<sup>2</sup>, Santos TC<sup>2</sup>, Terena SML<sup>2</sup>, Daysi da cruz Tobelem<sup>2</sup>  
Bussadori SK<sup>1,2</sup>, Fernandes KPS<sup>2</sup>, Mesquita-Ferrari RA<sup>1,2</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

2 Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

#### **Correspondência:**

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari

raquel.mesquita@gmail.com

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação;

Universidade Nove de Julho – UNINOVE

www.uninove.br

Rua Vergueiro, 349, CEP 01504001, São Paulo – SP, Brasil

Tel. +55 11 3385-9222

**Financiamentos:** Este trabalho teve apoio da UNINOVE e das seguintes agências de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (www.capes.gov.br; número do processo: **88887.475566/2020-00**) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (www.fapesp.br; número do processo: **2020/13976-0**).

## Resumo

A fotobiomodulação local (FBM) tem demonstrado efeitos positivos na hipertrofia compensatória (HC) que representa uma adaptação que ocorre no músculo como resposta a uma sobrecarga, resultando no aumento do diâmetro das fibras musculares. O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da fotobiomodulação vascular transcutânea sistêmica (FBMV) e da FBM local no tamanho da fibra muscular e no restabelecimento da marcha normal durante o processo HC em ratos. Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: grupo controle (n= 5), grupo hipertrofia (H) (n= 10), grupo H + FBMV (n= 10) e grupo H + FBM local (n= 10). A hipertrofia foi induzida pela ablação dos sinergistas do músculo plantar, levando a um aumento da carga neste músculo. O FBMV foi administrado sobre a veia caudal principal do rato e o FBM Local aplicado em 8 pontos sobre a região do músculo plantar. A área de secção transversal (AST) e o diâmetro da fibra muscular, a capacidade funcional da marcha e a sensibilidade mecânica, a relação entre o peso dos músculos esquerdo e direito (E/D), foram avaliados após sete e 14 dias. A FBMV induziu um aumento na AST após sete e 14 dias em comparação com o grupo H e um aumento na AST no grupo H+FBMV em comparação com o grupo H+FBML após 14 dias. Aos sete dias, um aumento no diâmetro da fibra muscular foi encontrado no grupo H+FBMV em relação ao grupo H. Aos 14 dias, um aumento no diâmetro da fibra foi encontrado em ambos os grupos H+FBML e H+FBMV em comparação com o grupo não irradiado (H) e o aumento foi significativamente mais pronunciado no grupo FBMV em comparação com o grupo FBML. A relação de massa D/E nos grupos H, H+FBML e H+FBMV foi menor que a do grupo controle após sete dias. Aos 14 dias, observou-se redução da massa nos grupos H e H+FBML em comparação ao grupo controle, a massa muscular do grupo H+FBMV permaneceu semelhante à do grupo controle. Em relação à sensibilidade mecânica, tanto o grupo H quanto os grupos irradiados apresentaram redução da sensibilidade em relação ao grupo controle após sete e 14 dias. Na análise funcional da marcha (IFC), os grupos tratados com FBM e o grupo não tratado apresentaram funcionalidade da marcha inferior ao grupo controle após sete dias. Aos 14 dias, a funcionalidade normal foi restabelecida em ambos os grupos irradiados próximo aos valores do grupo controle. Em conclusão, ambas as formas de irradiação modularam de forma positiva o processo de recuperação funcional e os aspectos morfológicos musculares durante a HC. A comparação de ambas as irradiações permitiram evidenciar efeitos mais pronunciados da FBMV no que se refere ao aumento da AST, diâmetro das fibras e manutenção do volume de massa e resultados semelhantes para as duas formas, local e vascular, no que se refere aos aspectos de sensibilidade mecânica e ao restabelecimento do índice normal de funcionalidade da marcha.

**Palavras-chave:** Músculo plantar; hipertrofia; Terapia com Luz de Baixa Intensidade; fotobiomodulação; fotobiomodulação vascular.

## ABSTRACT

The local photobiomodulation (PBM) has demonstrated positive effects on compensatory hypertrophy (CH) which represents an adaptation that occurs in muscle as a response to an overload, resulting in an increase in the diameter of muscle fibers. The aim of this study was to compare the effects of the systemic transcutaneous vascular photobiomodulation (VPBM) and the local PBM on muscle fiber size and the reestablishment of normal gait during the CH process in rats. Wistar rats were divided into four groups: control group (n= 5) hypertrophy group (H) (n= 10), H + VPBM (n= 10) group and H + local PBM group (n= 10). Hypertrophy was induced by ablation of the synergists of the plantar muscle, leading to an increase in load on this muscle. VPBM was administered over the rat's main tail vein and Local PBM was applied on 8 points over the plantar muscle region. The the cross-sectional area (CSA) and the muscle fiber diameter, the functional gait capacity and mechanical sensitivity, the ratio between the weight of the left and right (L/R) were evaluated after seven and 14 days. VPBM induced an increase in CSA after seven and 14 days in comparison to the H group and an increase in CSA in the H+VPBM group compared to the H+LPBM group after 14 days. At seven days, an increase in muscle fiber diameter was found in the H+VPBM group compared to the H group. At 14 days, an increase in the fiber diameter was found in both the H+LPBM and H+VPBM groups compared to the non-irradiated group (H) and the increase was significantly more pronounced in the VPBM group compared to the LPBM group. The L/R mass ratio in the H, H+LPBM and H+VPBM groups was lower than that of the control group after seven days. At 14 days, a reduction in mass was found in the H and H+LPBM groups in comparison to the control group, whereas the muscle mass in the H+VPBM group remained similar to that of the control group. Regarding mechanical sensitivity, both the H and irradiated groups exhibited a reduction in sensitivity in comparison to the control group after seven and 14 days. In the functional gait analysis (SFI), the groups treated with PBM and the untreated group had lower functioning than the control group after seven days. At 14 days, normal functioning was reestablished in both irradiated groups close to that of the control group. In conclusion, both forms of irradiation positively modulate the recovery process and the morphological aspects of functionality during a HC. The comparison of both irradiations showed more pronounced effects of VPBM with regard to the increase in CSA, fiber diameter and maintenance of mass volume and similar results for both forms, local and vascular, with regard to aspects of sensitivity mechanics and the reestablishment of the normal index of gait functionality

**Keywords:** Plantar muscle; hypertrophy; low-level light therapy; photobiomodulation; vascular photobiomodulation.

## Introdução

A notável capacidade adaptativa do tecido muscular, faz deste um tecido dinâmico<sup>(1,63-64)</sup>, capaz de alterar suas características morfológicas com o objetivo de suprir as suas diversas demandas funcionais<sup>(1,3)</sup>. Dentre estes estímulos a sobrecarga funcional representa um estímulo mecânico que age como um sensor desencadeante da hipertrofia muscular<sup>(4)</sup>, que é evidenciada quando a síntese de proteínas se sobrepõe à sua degradação<sup>(65-66)</sup>.

Condições clínicas que cursam com a necessidade de HC incluem acidentes automobilísticos, lesões musculares com ruptura de tendão e/ou tendinopatias, traumas musculares por esmagamento com comprometimento dos nervos, lesões nervosas parciais ou denervação<sup>(22, 67-68)</sup>. Outras situações que necessitam de HC incluem as doenças neurodegenerativas como a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e, especificamente nesse caso, há degeneração dos neurônios com conseqüente atrofia muscular progressiva devido a miogênese prejudicada pela desnervação que causa a sobrecarga das fibras ainda não comprometidas, a fim de compensar a déficit das fibras já acometidas<sup>(23)</sup>. Assim, indivíduos acometidos por esses tipos de alterações musculares, podem evoluir com graus variados de déficit funcional que poderão gerar um impacto negativo em sua qualidade de vida.

Um modelo experimental de hipertrofia compensatória (HC) muito utilizado para o estudo do processo de hipertrofia por sobrecarga funcional, se dá por meio da ablação dos músculos sinergistas causando sobrecarga no músculo remanescente que deverá se adaptar a essa nova demanda funcional conforme demonstrado e caracterizado na literatura<sup>(13-14, 69)</sup>. De acordo com Terena et al (2017)<sup>(5)</sup>, o momento em que é observado maior hipertrofia, é no período de 12 a 15 dias após a indução da HC, que é evidenciada pelo aumento da área de secção transversa (AST) das fibras, bem como de seu diâmetro. Dessa forma, o modelo de HC tem sido amplamente utilizado por permitir a observação das alterações morfológicas de um músculo sobrecarregado em um curto espaço de tempo.

Em condições em que há perda da função muscular especialmente de membros inferiores, é comum ocorrer um impacto direto sobre o padrão de funcionalidade da marcha devido á fraqueza muscular. Nesse contexto, recursos que permitam o restabelecimento do tecido muscular após alteração



da demanda funcional são de extrema importância para redução dos aspectos negativos relacionados a estas limitações. Neste sentido, a fotobiomodulação (FBM) com Laser em Baixa Intensidade (LBI), tem sido grandemente utilizada como um recurso terapêutico nas alterações musculoesqueléticas e nervosas<sup>(13-14, 70-71)</sup>.

Estudos utilizando a fotobiomodulação local (FBML), demonstraram resultados positivos em diferentes processos de adaptação e recuperação neuromuscular incluindo uma melhora da capacidade funcional na marcha de ratos após lesão nervosa periférica<sup>(25)</sup>, melhora no remodelamento do tecido conjuntivo (colágeno) e efeitos positivos sobre a expressão de mRNA e fatores de crescimento após lesão muscular aguda<sup>(72, 44)</sup>. Em modelos de HC a FBML promoveu uma melhor organização e deposição do colágeno, bem como a modulação de citocinas relevantes para o aumento da massa muscular<sup>(14-13)</sup>.

Uma modalidade de FBM que tem demonstrado bons resultados como recurso terapêutico é a fotobiomodulação vascular (FBMV) transcutânea, sendo realizada de forma não invasiva sobre a região de grandes vasos de forma a induzir uma modulação sistêmica sem necessidade de determinação da área a ser tratada e abrangendo áreas maiores<sup>(46)</sup>. Estudos anteriores demonstraram alguns efeitos positivos da FBMV transcutânea ou intravascular sobre os processos biológicos em diferentes situações incluindo a redução da área de cicatrização de feridas, melhora da microcirculação e modulação de citocinas após angioplastia <sup>(51-52,54)</sup>.

Kilik et al. (2019)<sup>(53)</sup> realizaram um estudo proteômico do plasma sanguíneo de ratos Wistar irradiados na área do coração (artérias coronárias) utilizando a FBMV infravermelha de forma transcutânea e verificaram que a FBMV promoveu um aumento quantitativo das proteínas (haptoglobina, hemopexina e fibrinogênio gama). Os autores correlacionam o aumento encontrado dessas proteínas nos animais irradiados a um efeito protetor da FBMV contra o estresse oxidativo e seus danos no organismo.

Em um estudo clínico utilizando a FBM intravascular no espectro vermelho ( $\lambda$  632nm, 4mW e energia de 14,4 J), por 1 hora, durante 15 dias, em pacientes com lesão medular crônica, observou-se que a FBM promoveu o alívio do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial, por promover um

reforço nas defesas antioxidantes e por melhorar a atividade mitocondrial das células sanguíneas <sup>(55)</sup>.

Poucos estudos avaliaram os efeitos da FBM durante o processo de HC do músculo esquelético, não havendo relatos sobre seus efeitos quando aplicado de forma vascular ou local sobre a recuperação funcional do músculo durante o processo de HC. Também não há relatos da aplicação da FBMV transcutânea sobre os aspectos morfológicos do músculo plantar frente a HC, nem tão pouco, relatos comparativos sobre os efeitos desses dois tipos de terapia.

Como hipótese, é esperado que ambos os tipos de FBM atuem na HC modulando os aspectos morfológicos e funcionais do músculo, promovendo uma resposta positiva no aumento da massa muscular e restabelecendo o padrão de funcionalidade da marcha durante o processo de HC do músculo plantar. Assim, o objetivo do estudo foi comparar os efeitos da FBM aplicada de forma vascular e local sobre os aspectos morfológicos (AST e Diâmetro da fibra muscular) e sobre o índice de massa muscular, sensibilidade mecânica e os aspectos funcionais da marcha de ratos Wistar durante o processo de HC do músculo plantar.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

A metodologia do estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho - UNINOVE (CEUA n 4624150520) e todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### **ANIMAIS**

Foram utilizados 35 ratos Wistar machos, com idade de 2 meses e peso médio entre +/-250g até +/-280g, mantidos no biotério da UNINOVE em caixas plásticas apropriadas, temperatura ambiente de 22°C, umidade relativa de 40%, luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro) e comida e água *ad libitum*.

### **Grupos experimentais**

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (controle) ou intervenção (cirurgia/tratamento) e analisados nos períodos de 7 e 14 dias após início do protocolo

- 1. Grupo Controle:** Animais não foram submetidos a procedimento cirúrgico e/ou irradiação com FBM e eutanasiados no sétimo ou décimo quarto dia de experimento. Os músculos plantares bilateralmente foram removidos (n=10/ 5 animais);
- 2. Grupo Hipertrofia (H):** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas (gastrocnêmio e sóleo) do músculo plantar (somente pata esquerda). Não foram submetidos a FBM e foram eutanasiados após 7 (5 animais eutanasiados n=5) e 14 (5 animais eutanasiados n=5) dias do início do experimento;
- 3. Grupo Hipertrofia + Fotobiomodulação Local (H+FBML):** Os animais foram submetidos à ablação dos sinergistas do músculo plantar (somente pata esquerda) e neste grupo foi realizada a irradiação com FBML na região do músculo plantar. Os animais foram eutanasiados após 7 (5 animais eutanasiados n=5) e 14 (5 animais eutanasiados n=5) dias do início do experimento;
- 4. Grupo Hipertrofia + Fotobiomodulação Vascular (H+FBMV):** Os animais foram submetidos à ablação dos sinergistas do músculo plantar (somente pata esquerda) e neste grupo foi realizada a irradiação com FBMV. Nesse grupo a irradiação foi realizada na região do dorso da cauda dos animais. Os animais foram eutanasiados após 7 (5 animais eutanasiados n=5) e 14 dias (5 animais eutanasiados n=5) do início do experimento.

### **Procedimento cirúrgico**

O modelo da HC usado no presente estudo consiste na remoção cirúrgica dos músculos sinergistas do músculo plantar, unilateralmente ou bilateralmente, impondo uma sobrecarga de trabalho funcional sobre esse

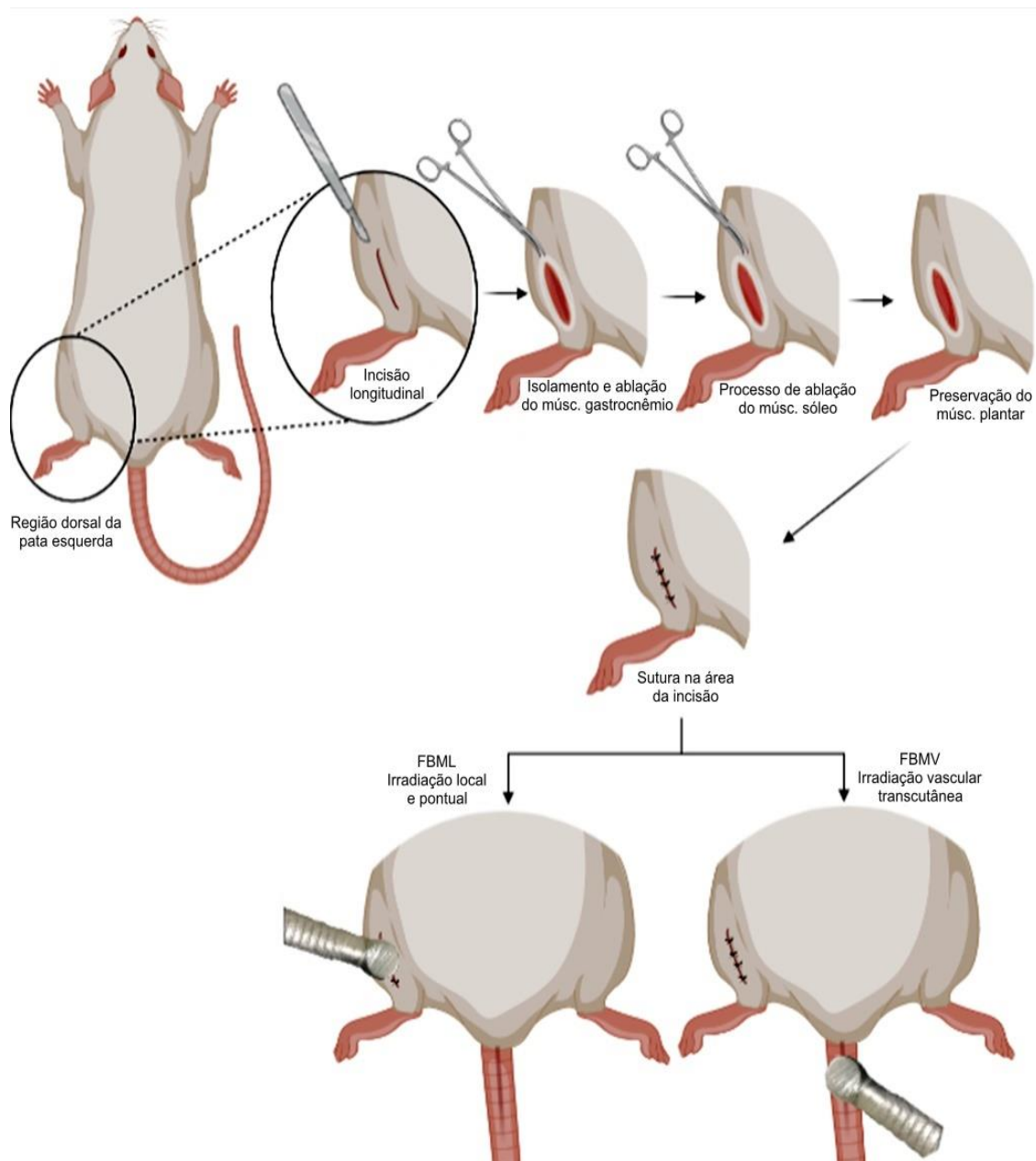
músculo. Esse modelo cirúrgico foi utilizado por Mc Carthy et al. (2011)<sup>(57)</sup>, foi descrito e utilizado por Terena et al. (2017)<sup>(5)</sup> e Martinelli et al. (2020)<sup>(13)</sup>.

No presente estudo foi feita a remoção unilateral somente pata esquerda. Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal a base de ketamina 10% (0.2 mg/100 g do peso) e Xilazina 2% (0.1 mg/100 g do peso). Em seguida, foi realizada a tricotomia seguida da incisão longitudinal na região dorsal da pata traseira esquerda de  $\pm$  2cm e exposição do músculo gastrocnêmio. Esses tendões foram isolados e seccionados para permitir a remoção parcial do músculo. O mesmo procedimento foi realizado cuidadosamente para a remoção do músculo sóleo, evitando lesões em nervos e vasos sanguíneos circunvizinhos. O músculo plantar situado abaixo dos músculos removidos foi preservado e recebeu a sobrecarga funcional.

Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (espessura 5.0; (Procure)).

A superfície ocular de cada animal foi lubrificada com gaze embebida em soro fisiológico (NaCl 0,9%) para evitar o ressecamento ocular, os animais foram acomodados em caixas plásticas sobre colchonete aquecido (36-37 °C) para evitar hipotermia e ficaram sob observação até estarem livres do efeito dos anestésicos.

Com o objetivo de diminuir a sensibilidade dolorosa pós-operatória os animais receberam administração subcutânea de analgésico dipirona 50 mg/kg e Tramadol 5 mg/kg (Cloridrato de tramadol a 2%) a cada 8 horas, durante 3 dias.



Procedimento cirúrgico de ablação dos sinérgicos (músculos gastrocnêmio e sóleo), para indução da hipertrofia do músculo plantar, demonstrando na sequência a incisão na região cirúrgica, exposição e secção do músculo gastrocnêmio lateral e medial, exposição e secção do músculo sóleo, músculo plantar preservado após a retirada dos seus sinérgicos, sutura na área de incisão e área irradiada com FBM de forma local ou vascular. **Fonte do próprio autor, desenvolvida no Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>)**

### Procedimento de Fotobiomodulação Vascular (FBMV)

Imediatamente após a cirurgia, e em todos os dias do período experimental (7 ou 14 dias), os animais foram irradiados com um LBI

(TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil) aplicado sobre a veia caudal do animal, com os parâmetros descritos na tabela 1, de acordo com o descrito por Martinelli et al. (2020)<sup>(13)</sup> e Terena et al. (2018)<sup>(14)</sup>. A dosimetria também foi baseada nos parâmetros descritos por Alves et al. (2014)<sup>(10)</sup> e Mesquita e Ferrari et al. (2011)<sup>(45)</sup> e por Lopes 2021<sup>(50)</sup> que utilizou a FBMV infravermelha aplicada em um único ponto sobre a cauda de ratos em um modelo de lesão muscular. Para o procedimento de irradiação, os animais foram contidos manualmente e a aplicação foi realizada diariamente por técnica pontual, sendo um único ponto diretamente sobre a pele do dorso da cauda dos animais submetido a HC do músculo plantar, (Roshchina et al. (2003); Yamaikina et al. (2012); Tomimura et al. (2014), da Silva et al. (2020)<sup>(58-61)</sup>). Para evitar refração do feixe o laser foi aplicado em um ângulo de 90° entre o emissor e a pele do animal. Em ambas as irradiações a potência de emissão da luz do laser foi aferida utilizando o “LaserCheck power meter” (MM Optics – São Carlos – SP – Brasil).

### **Procedimento de Fotobiomodulação Local (FBML)**

Imediatamente após a cirurgia, e em todos os dias do experimento (7 ou 14 dias), os animais foram irradiados com um LBI (TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil), usando os parâmetros descritos na tabela 1 e de acordo com o descrito por Martinelli et al. (2020)<sup>(13)</sup> e Terena et al. (2018)<sup>(14)</sup>. A irradiação foi realizada de forma unilateral (pata esquerda). Para o procedimento de irradiação os animais foram contidos manualmente, e a aplicação foi realizada por técnica pontual, diretamente sobre a pele que recobre o músculo plantar na região da incisão e ao redor da área, sendo oito pontos de irradiação (Martinelli et al. (2020)<sup>(13)</sup>; Terena et al. (2018)<sup>(14)</sup>) Os animais avaliados por 7 dias, receberam 7 irradiações e os animais avaliados por 14 dias receberam 14 irradiações realizadas diariamente.

**Tabela 1:** Parâmetros utilizados para a FBM local e vascular utilizando o LBI durante o processo de hipertrofia compensatória.

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAL)	
	Local	Vascular
<b>Modo de Aplicação</b>	Local	Vascular
<b>Local da irradiação</b>	Pata esquerda	Dorso da cauda
<b>Comprimento de onda</b>	780nm	780nm
<b>Frequência do Laser</b>	Contínuo	Contínuo
<b>Área do feixe</b>	0,04 cm <sup>2</sup>	0,04 cm <sup>2</sup>
<b>Potência média</b>	40 mW	40 mW
<b>Irradiância na Abertura</b>	1W/cm <sup>2</sup>	1W/cm <sup>2</sup>
<b>Exposição Irradiante</b>	10 J/cm <sup>2</sup>	80 J/cm <sup>2</sup>
<b>Energia por Ponto</b>	0,4 J	10 J
<b>Total de pontos</b>	8	1
<b>Tempo por Ponto</b>	10 segundos	80 segundos
<b>Tempo total De exposição</b>	80 segundos	80 segundos
<b>Energia total</b>	3,2 J	3,2 J

### **Análise de sensibilidade mecânica (Teste de von Frey)**

A avaliação foi realizada após 7 ou 14 dias da indução da HC, utilizando-se um analgesímetro digital (INSIGHT®Ribeirão Preto/SP, Brasil). O teste consistiu em avaliar a sensibilidade mecânica através do aumento da pressão nas patas traseiras, por meio de um transdutor com capacidade de 0,1-1000g

e tempo de reação de 1ms, conectado a um contador de força digital expresso em gramas<sup>(24-25)</sup>. Os animais foram acomodados em caixas de acrílico, o piso da caixa foi constituído por uma malha confeccionada com arame não maleável de 1mm de espessura que permitiu o acesso à superfície plantar das patas traseiras. Nos três dias que antecederem a coleta dos dados do teste de sensibilidade mecânica os animais foram habituados por uma hora no mesmo ambiente sem nenhum tipo de interrupção sonora que interferisse na realização do teste, com o intuito de adaptá-los ao ambiente. O contato do transdutor com a superfície plantar foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno de 0,5 mm de diâmetro acoplada à ponta do transdutor, o investigador aplicou uma força linearmente crescente no centro das plantas das patas esquerdas dos ratos através dos espaços da malha, até que o animal reproduzisse uma resposta de retirada da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por 3 vezes e a média aritmética da resposta de retirada foi obtida a partir das três medidas. Para essa análise foram coletados os dados de 5 animais por grupo. Os dados foram representados em grama.

### **Análise Funcional da marcha**

Para a análise funcional da marcha ao sétimo ou décimo quarto dia do experimento utilizou-se o teste de Índice Funcional Ciático (IFC)<sup>(26-27)</sup>, a mesma análise também foi descrita e utilizada por Andreo et al. 2019<sup>(25)</sup>. Para obtenção das pegadas, as patas dos animais foram mergulhadas em tinta, deixando a cor azul impressa nas tiras de sulfite presente no percurso da passarela que os animais caminharam. Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram treinados a caminhar em um dispositivo contendo uma passarela com as laterais fechadas e um abrigo escuro e coberto ao final de seu percurso<sup>(26-27)</sup>.

Para essa análise foram coletados os dados de 5 animais por grupo. Os dados do teste contendo as impressões das patas foram digitalizadas e analisadas de acordo com os parâmetros sugeridos por Bain et al. 1989<sup>(27)</sup> e Andreo et al.(2019)<sup>(25)</sup> conforme descritos a seguir: comprimento da pegada (PL, ou print length), abertura total dos dedos (do 1° ao 5° dedo – TS ou total spread of toes) e abertura dos dedos intermediários (do 2° ao 4° dedo IT ou intermediate toes).



O IFC foi calculado a partir da fórmula:

$$IFC = -38,3 \times \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109,5 \times \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13,3 \times \left( \frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

$$IFT = -37,2 \times \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 104,4 \times \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 45,6 \times \left( \frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

$$IFP = -174,9 \times \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 80,3 \times \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 13,4$$

Sendo:

E: experimental

N: normal

PL: comprimento da pegada

TS: distância entre o 1º e o 5º dedo

IT: distância entre o 2º e 4º dedo

IFC: Índice Funcional do Ciático

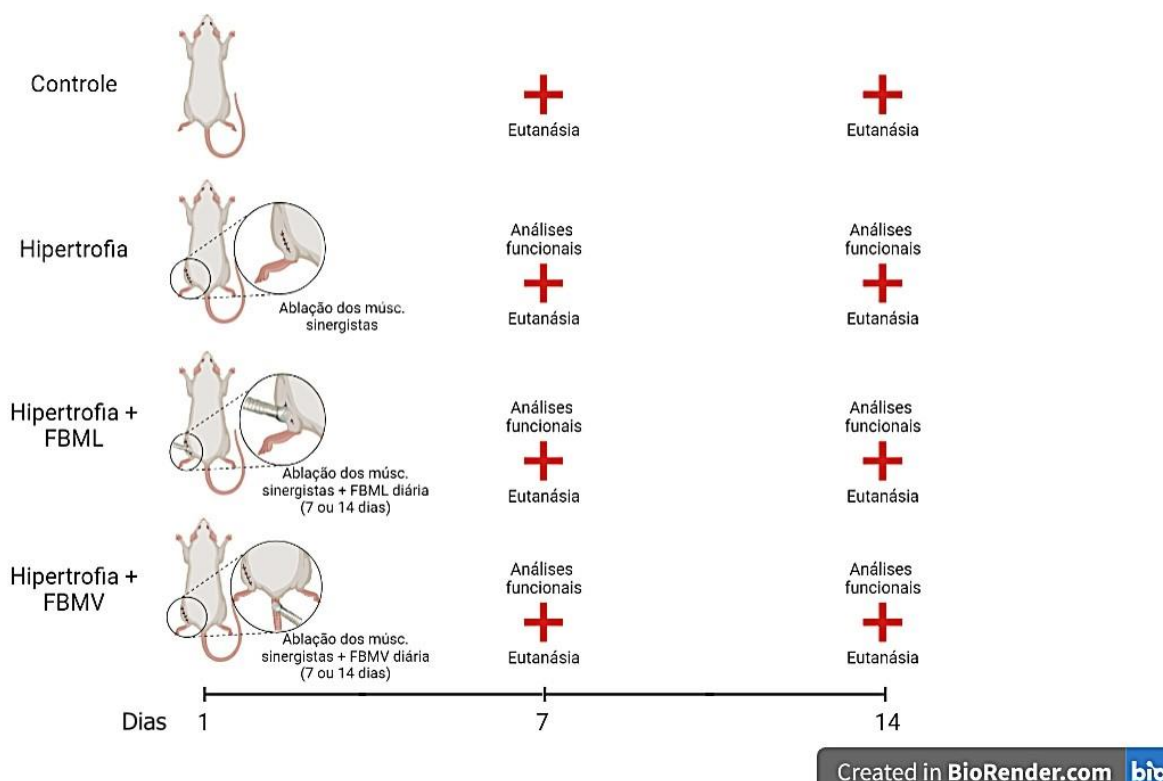
IFT: Índice Funcional do Tibial

IFP: Índice Funcional do Peroneio (fibular)

Os valores próximos de zero correspondem à função normal, enquanto o aumento na negatividade do teste, indica maior disfunção, sendo o valor -100 representativo de máxima disfunção <sup>(27)</sup>.

### **Procedimento de eutanásia e coleta do material**

Ao término do período experimental de cada grupo (7 e 14 dias), os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos ketamina (240 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). Os músculos plantares foram removidos e encaminhados para análise da massa muscular e análise histológica.



Linha do tempo do estudo demonstrando os 4 grupos experimentais; Intervenção diária por 7 ou 14 dias com FBMV ou FBML nos grupos tratados; Análises funcionais e eutanásia realizadas ao sétimo ou décimo quarto dia do experimento. **Fonte do próprio autor, desenvolvida no Biorender (<https://biorender.com/>)**

### Análise da massa muscular

Após a eutanásia dos animais dos diferentes grupos e períodos de avaliação, os músculos plantares direito e esquerdo foram cuidadosamente removidos por corte do tendão e inserção óssea e limpos conforme descrito por Shen et al. (2013)<sup>(62)</sup>. Os músculos foram pesados (peso úmido) em uma balança semianalítica e a massa muscular foi calculada para cada animal usando a fórmula descrita por Shen et al. (2013)<sup>(62)</sup>:

$$r = \frac{E}{D}$$

no qual:

r: razão de massa muscular

E: massa do músculo esquerdo (músculo submetido a HC)

D: massa do músculo direito (músculo não submetido a HC)

Para essa análise foram coletados os dados de 5 animais por grupo.

### **Análise histológica do tecido muscular**

As amostras foram fixadas e mantidas em temperatura ambiente em formol tamponado a 10% (pH 7,4).

Em seguida, foi realizada a desidratação do material por meio de incubações em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 1h cada, imersas três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol (Reagen). As amostras foram incubadas por 12h a 60°C em parafina (paraplast, Sigma, USA) e incluídas transversalmente com as porções centrais posicionadas mais externamente no bloco. 3 cortes de 10µm de espessura foram realizados no micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha) sendo colocados em lâminas de microscopia e mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas.

As lâminas foram submetidas às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas por microscopia de luz (microscópio Axioplan 2, Zeiss, Alemanha) sendo avaliados os seguintes aspectos morfológicos: Área de secção transversa (AST) e diâmetro das fibras musculares.

Para permitir a análise quantitativa destes aspectos foram consideradas 3 áreas por lâmina de 3 animais/grupo, 100 fibras foram medidas em cada área para análise de AST e diâmetro das fibras. Os campos foram fotografados utilizando um microscópio de luz convencional (Zeiss Axioplan2, Alemanha) com aumento final de 400X, para permitir a contagem dos aspectos descritos. A análise foi realizada através do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA) e os dados foram submetidos à análise estatística.

### **Análise estatística**

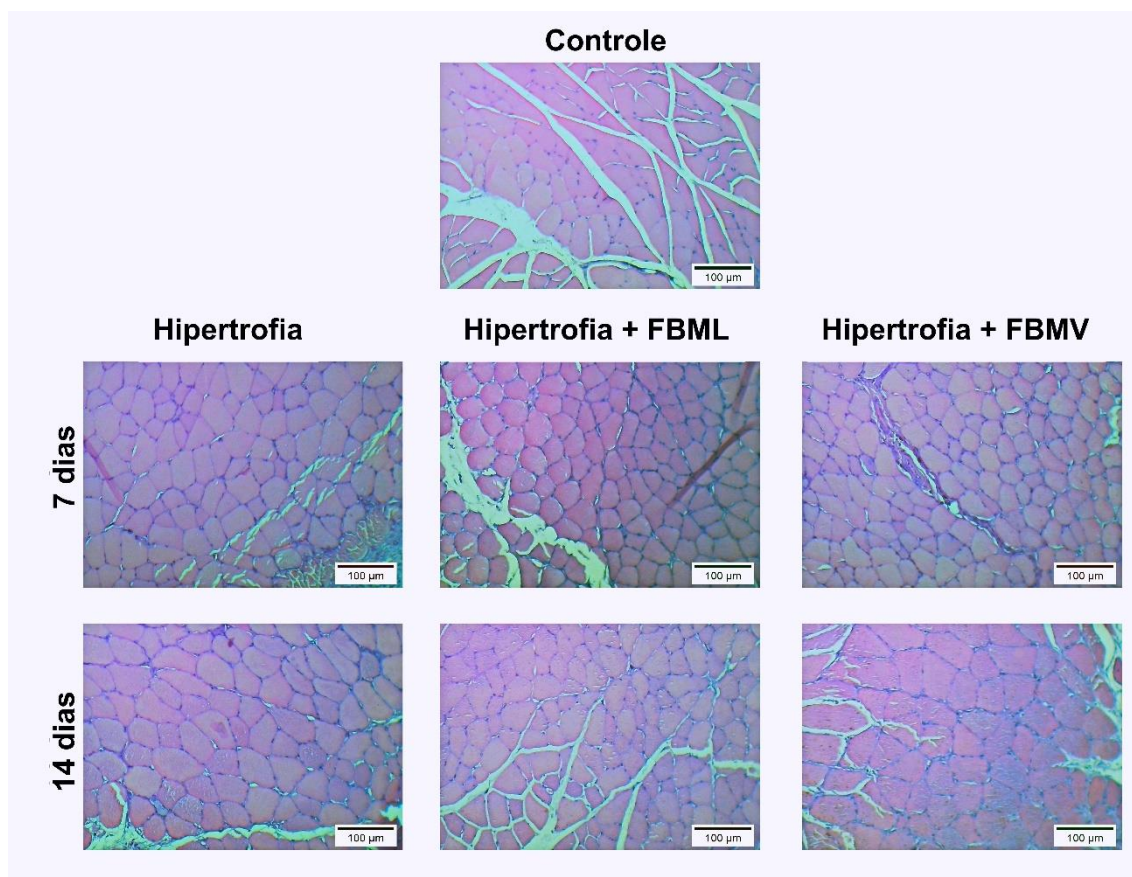
O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para determinar anormalidade dos dados. Como a distribuição gaussiana foi demonstrada, os dados foram

expressos em média e erro padrão da média. A comparação dos grupos foi realizada com ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os dados foram analisados usando o GraphPad Prism 5.00 programa (GraphPad Software, San Diego, CA). O nível de significância estipulado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Análise dos aspectos morfológicos por H&E

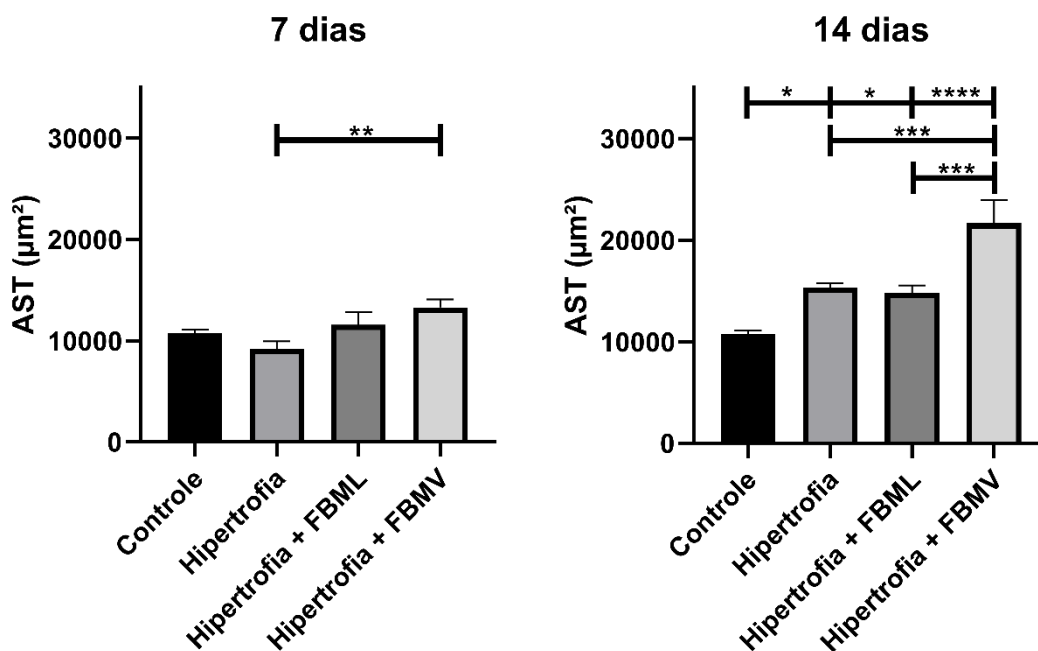
Na análise qualitativa dos cortes histológicos é possível verificar em 7 e 14 dias um aumento da área de secção transversa (AST) e do diâmetro fibras musculares, mais pronunciado nos grupos irradiados com FBM vascular (Figura 8).



**Figura 8:** Cortes histológicos transversais dos músculos plantares corados com hematoxilina e eosina (400X); grupo controle; grupo Hipertrofia; grupo Hipertrofia + FBML e grupo Hipertrofia + FBMV.

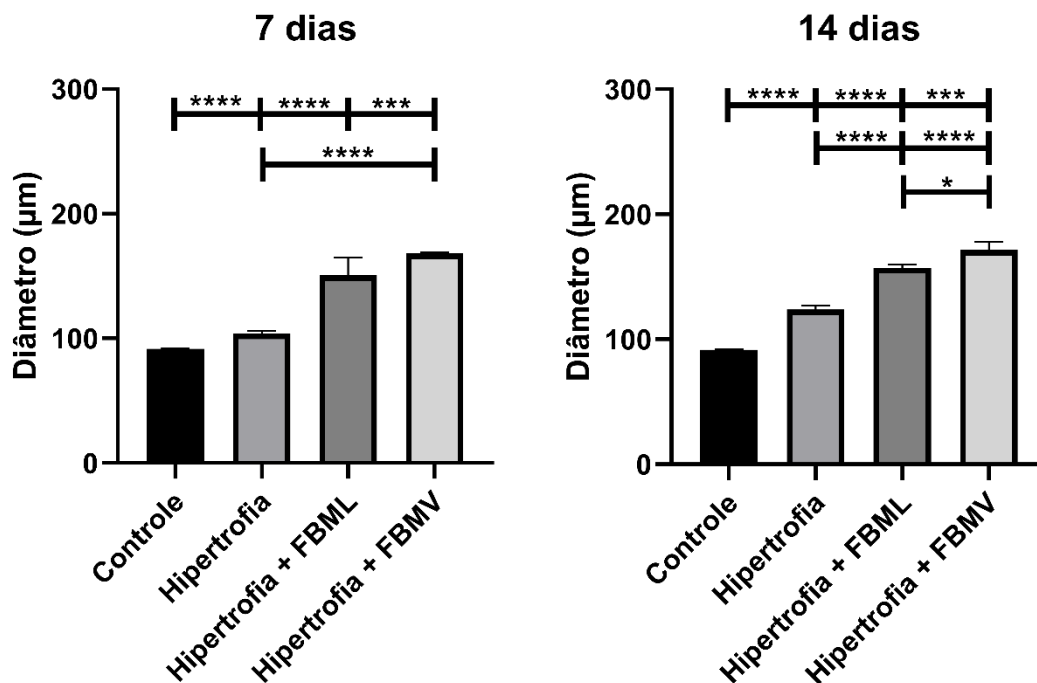
### Determinação da hipertrofia das fibras musculares

Os resultados da análise quantitativa da área secção transversa (AST), demonstraram um aumento após 7 dias somente no grupo H + FBMV em comparação ao grupo H. Após 14 dias, observou-se um aumento da AST das fibras musculares no grupo H+ FBMV quando comparado ao grupo H e ao grupo que recebeu a irradiação local (H+FBML). (Figura 9)



**Figura 9:** Valores médios  $\pm$  erro padrão da AST do músculo plantar dos diferentes grupos experimentais avaliados após 7 e 14 dias de HC. Anova - Tukey, \* $p < 0,05$  vs controle; \*\* $p < 0,01$  vs hipertrofia e \*\*\* $p < 0,001$  vs controle, hipertrofia e hipertrofia +FBML.

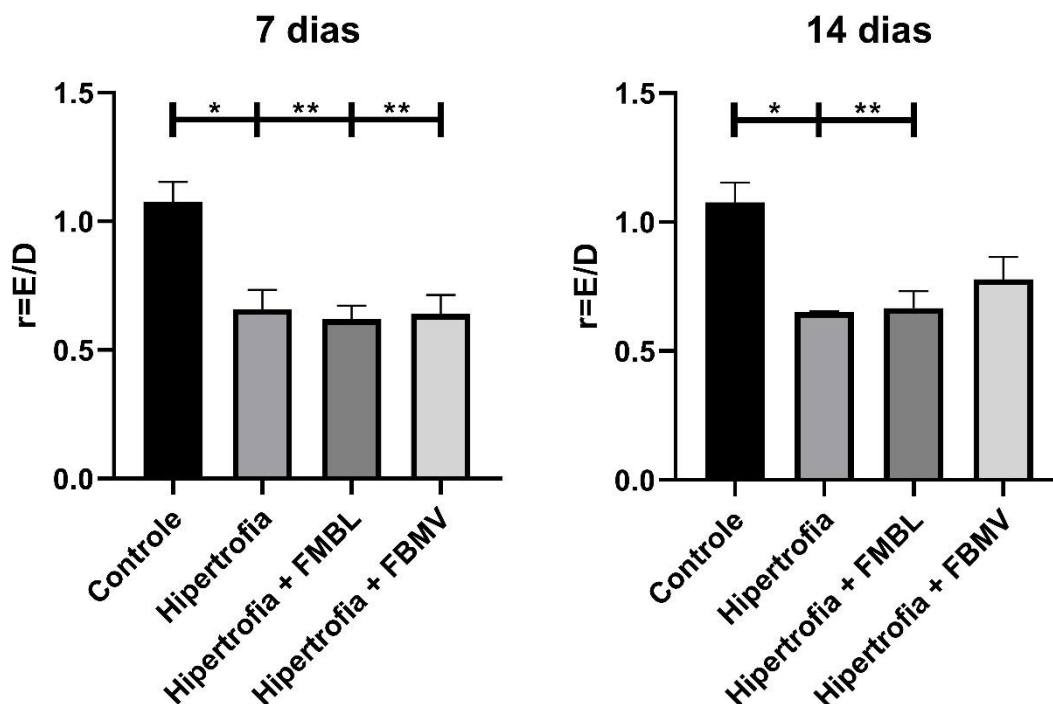
Os resultados da análise quantitativa do diâmetro das fibras, demonstraram que após 7 dias houve um aumento no diâmetro das fibras apenas no grupo H+FBMV quando comparado ao grupo H. Já aos 14 dias, este aumento foi observado em ambos os grupos irradiados H+FBML e H+FBMV quando comparados ao grupo H. Além disso, este aumento foi estatisticamente maior no grupo que recebeu a irradiação vascular (H+ FBMV) quando comparado ao grupo local (H+FBML) (Figura 10).



**Figura 10:** Valores médios  $\pm$  erro padrão do diâmetro das fibras musculares do músculo plantar dos diferentes grupos experimentais avaliados após 7 e 14 dias de HC. Anova - Tukey, \* $p < 0,05$  vs hipertrofia + FBML; \*\*\* $p < 0,001$  vs controle e vs hipertrofia.

#### **Análise da relação de massa muscular esquerda/direita**

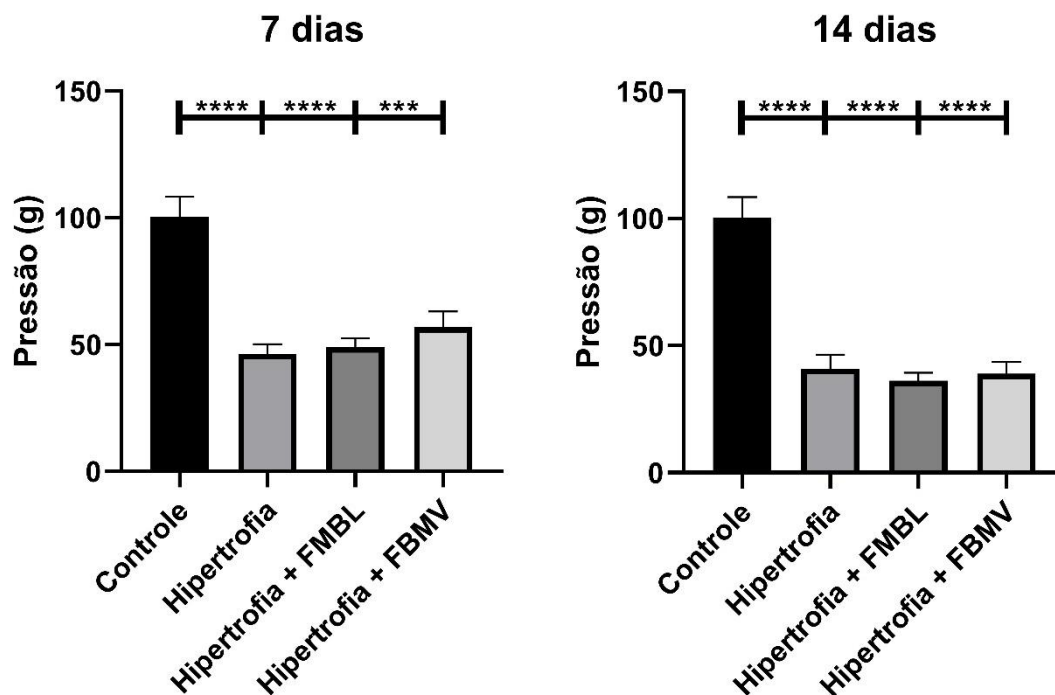
Os resultados da análise de massa muscular, demonstraram uma redução nos grupos H, H+FBML e H+FBMV quando comparados ao grupo controle após 7 dias. Não houve diferença entre os grupos H, H+FBML e H+FBMV após 7 dias. No período de 14 dias houve redução da massa muscular nos grupos H e H+FBML quando comparados ao grupo controle. Enquanto no grupo H+FBMV houve manutenção da massa muscular, visto que não diferiu estatisticamente do grupo controle (Figura 11).



**Figura 11:** Valores médios  $\pm$  erro padrão da relação de massa muscular esquerda/ direita do músculo plantar dos diferentes grupos experimentais avaliados após 7 e 14 dias de HC. Anova - Tukey, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs controle.

### **Análise de sensibilidade mecânica**

Os resultados de sensibilidade mecânica demonstraram um aumento da pressão indicando um menor limiar de sensibilidade nos grupos H, H+FBML e H+FBMV quando comparados ao grupo controle após 7 e 14 dias. Não foram encontradas diferenças entre os grupos H e os grupos H+ FBM local e H+FBMV em nenhum dos períodos experimentais (Figura 12).



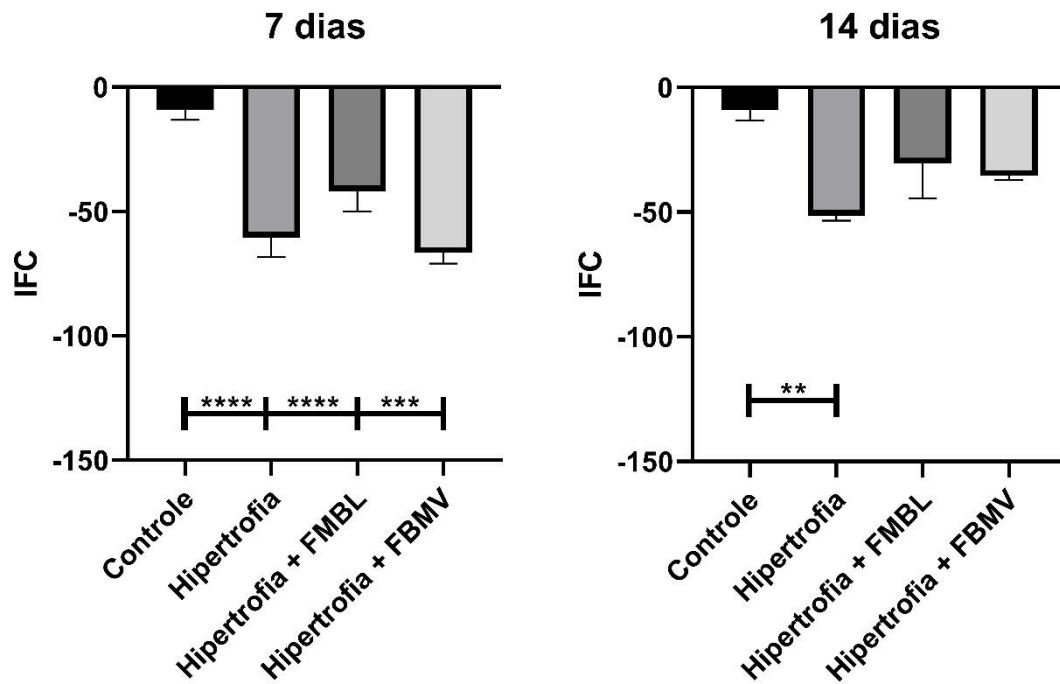
**Figura 12:** Valores médios  $\pm$  erro padrão da análise de sensibilidade mecânica das patas traseiras dos diferentes grupos experimentais avaliados após 7 e 14 dias de HC. Anova - Tukey, \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

### Análise funcional da marcha

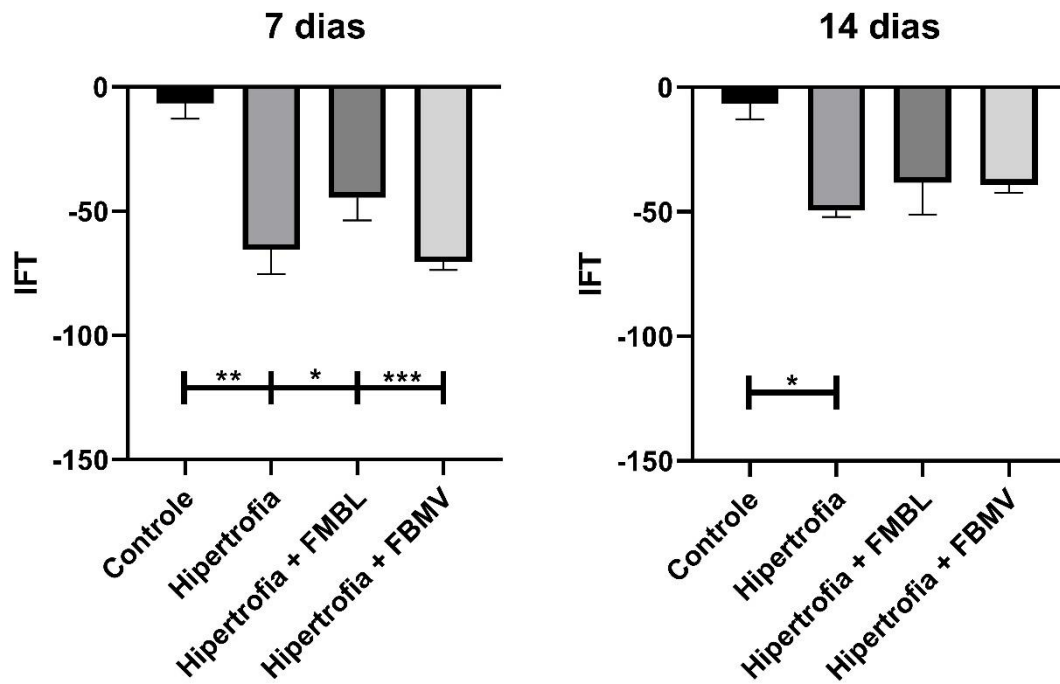
Os resultados da análise funcional da marcha demonstraram que o grupo controle, como esperado, apresentou o Índice Funcional do Ciático (IFC), Índice Funcional do Tibial (IFT) e Índice Funcional do Peroneio (IFP) com valores próximos a zero, que são indicativos de marcha normal. Após 7 dias, os grupos H, H+FBML e H+FBMV demonstraram um aumento nos escores de IFC, IFT e IFP quando comparados ao grupo controle indicando acometimento da marcha. Não houve diferença significativa entre os grupos H, H+FBML e H+FBMV após 7 dias. Após 14 dias foram observados escores maiores no IFC, IFT e IFP do grupo H quando comparado ao grupo controle. Contudo, não houve diferenças significativas entre os grupos H+FBML e H+FBMV quando comparados ao grupo controle evidenciando melhor funcionalidade da marcha nos grupos



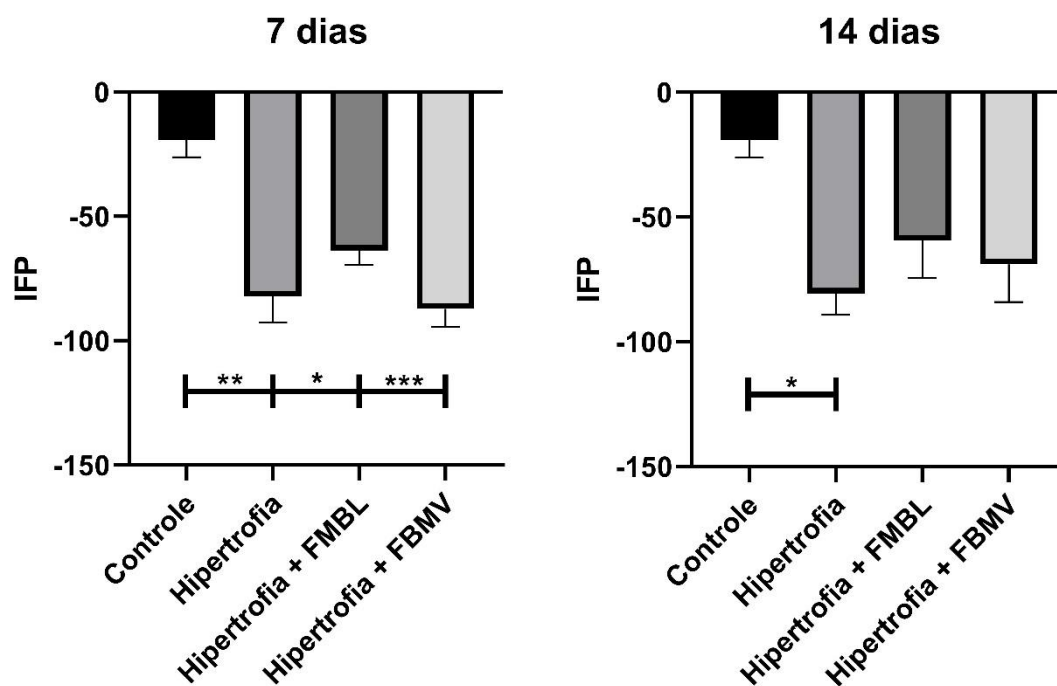
irradiados em relação ao que não recebeu irradiação. Após 14 dias não houve diferenças significantes entre os grupos H, H+FBL e H+FBMV (Figuras 13, 14 e 15).



**Figura 13:** Valores médios  $\pm$  erro padrão da análise funcional da marcha pelo Índice Funcional do Ciático (IFC) dos diferentes grupos experimentais avaliados após 7 e 14 dias de HC. Anova - Tukey, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.



**Figura 14:** Valores médios  $\pm$  erro padrão da análise funcional da marcha pelo Índice Funcional do Tibial (IFT) dos diferentes grupos experimentais avaliados após 7 e 14 dias de HC durante a HC. Anova - Tukey, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.



**Figura 15:** Valores médios  $\pm$  erro padrão da análise funcional da marcha pelo Índice Funcional do Peroneiro (IFP) dos diferentes grupos experimentais avaliados após 7 e 14 dias de HC. Anova - Tukey, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

## 5. DISCUSSÃO

---

Em modelos experimentais, o músculo plantar é geralmente o músculo de escolha para indução da HC, isso devido à sua diversidade nos diferentes tipos de fibras. No presente estudo e em consonância com a literatura, também escolhemos o músculo plantar como o modelo ideal para desencadear uma resposta hipertrófica satisfatória em um curto espaço de tempo como foi observado em estudos prévios<sup>(5,19,38)</sup> e confirmados pelos presentes achados que incluem aumento da AST e diâmetro da fibra.

O tempo estabelecido no presente estudo para o aumento da massa muscular através do modelo de HC, foi definido de acordo com os achados na literatura. Segundo Terena et al. 2017<sup>(5)</sup> o período de maior hipertrofia nesse modelo, ocorre entre 12 e 15 dias após a cirurgia de ablação sinérgica.

No presente estudo, avaliou-se os efeitos da FBMV sistêmica não invasiva e a comparação destes com a forma local de FBM infravermelha (780nm) no que se refere as características de adaptação morfológicas e aspectos funcionais do músculo plantar durante a HC.

No processo de HC, busca-se o aumento da massa muscular para melhor atender a demanda funcional a que um determinado músculo esteja exposto. Nesse contexto, os resultados relacionados a AST demonstraram que em 7 e 14 dias houve um aumento no grupo que recebeu a FBMV quando comparado ao grupo H demonstrando que a forma de aplicação sistêmica foi eficiente neste aspecto tão necessário para a adaptação frente ao aumento de demanda funcional. Além disso, em 14 dias o grupo FBMV evidenciou uma AST maior que o grupo tratado com FBML, demonstrando mais uma vez um efeito potencializado neste aspecto em relação a forma local de irradiação. De igual modo, os resultados relacionados ao diâmetro das fibras demonstraram uma influência positiva da irradiação vascular e local, visto que após 7 dias um aumento no diâmetro das fibras foi encontrado no grupo H+FBMV quando comparado ao grupo somente H. Em 14 dias ambos os grupos irradiados mostraram maior diâmetro de suas fibras musculares. O grupo FBMV apresentou maior diâmetro em suas fibras que o grupo FBML evidenciando assim o aspecto positivo da FBM infravermelha para o aumento da área da

fibra, bem como, para o aumento do diâmetro das fibras musculares favorecendo assim o processo de HC.

Quanto ao uso da FBMV como recurso terapêutico para o tratamento das desordens musculares, Lopez et al. 2021<sup>(50)</sup>, utilizando um modelo de lesão muscular *in vivo*, avaliaram os efeitos da FBMV infravermelha ( $\lambda = 780\text{nm}$ , 40 mW, 3,2 J, 1 ponto de aplicação sobre a veia localizada na base da cauda do animal e tempo de exposição de 80s), encontraram diversos efeitos positivos tais como: redução da área da lesão muscular após 5 e 7 dias, formação de novas fibras musculares imaturas após 7 dias, redução do edema e melhor organização do tecido após 5 dias da indução da lesão nos animais tratados com FBMV. Esses achados somam-se aos resultados do presente estudo demonstrando a relevância da FBMV na melhora dos aspectos morfológicos do músculo frente aos processos de lesões e/ou adaptações a que este tecido pode ser exposto.

Estudos prévios que utilizaram a FBM aplicada apenas de forma local sobre o músculo esquelético, também demonstraram que a FBM pode influenciar no aumento da AST da fibra e de seu diâmetro. No estudo de Andreo et al. (2020)<sup>(71)</sup>, utilizando-se a FBM local em um modelo de lesão nervosa periférica em ratos com os mesmos parâmetros ( $\lambda = 780\text{ nm}$ ,  $10\text{ J/cm}^2$ , 40 mW, e  $3.2\text{ J/cm}^2$  de energia total) aplicada sobre a região do músculo tibial anterior ou do nervo ciático, ou ainda associando a aplicação sobre o músculo e sobre o nervo, encontraram um aumento da AST e do diâmetro das fibras musculares após 21 e 28 dias de irradiações diárias. Terena et al. (2015)<sup>(3)</sup>, usando FBM aplicada de forma local ( $\lambda = 780\text{ nm}$ ,  $10\text{ J/cm}^2$ , 40 mW, e  $3.2\text{ J/cm}^2$  de energia total) em um modelo de HC do músculo plantar semelhante ao modelo utilizado, mas que difere pelo fato da HC ter sido induzida pela ablação bilateral dos músculos sinergistas, também encontraram um aumento da AST da fibra após 14 dias de irradiações.

Em um modelo de atrofia muscular por desuso Nakano et al. (2009)<sup>(73)</sup> demonstraram que a FBML ( $\lambda = 830\text{nm}$ , 60 mW; tamanho de ponto de  $0,3\text{ cm}^2$ , por 180s), utilizada por 14 dias durante a fase de recuperação da atrofia, embora não tenha recuperado o diâmetro das fibras até aos valores normais (grupo controle), promoveu um aumento no diâmetro das fibras no grupo irradiado quando comparado ao grupo somente recuperação. Assim, os autores

sugerem que a FBM pode atuar de forma positiva na recuperação da atrofia muscular por desuso. Juntos esses achados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, no que diz respeito a ação da FBM em interferir na resposta hipertrófica do músculo, promovendo alterações importantes nas características morfológicas de músculos acometidos por uma sobrecarga mecânica.

A hipertrofia das fibras musculares é um evento comum e já esperado em um músculo sobrecarregado. Vale ressaltar, porém, um achado surpreendente no presente estudo ao observar que a FBM quando aplicada de forma vascular transcutânea intensificou esse evento. Esse achado demonstra uma excelente capacidade modulatória da irradiação vascular em influenciar na morfologia do músculo de forma positiva frente a HC tanto quanto a FBML, que já demonstrou ser eficaz no aumento da AST de um músculo sobrecarregado <sup>(3)</sup>.

Os resultados da análise da relação de massa muscular demonstraram que em 14 dias, somente a irradiação vascular (FBMV) foi capaz de promover aumento da massa muscular apresentando valores semelhantes ao grupo controle, demonstrando a melhor capacidade da FBMV em manter a massa muscular próximo aos valores encontrados no grupo controle na segunda semana do protocolo de FBM vascular.

Terena et al. (2015)<sup>(3)</sup>, relataram um aumento do peso muscular após 14 dias de indução de HC nos animais que receberam ou não FBM local ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ ,  $10 \text{ J/cm}^2$ ,  $40 \text{ mW}$ , e  $3.2 \text{ J/cm}^2$  de energia total). Porém, a comparação do aumento de massa muscular desse estudo, foi feita em relação ao peso corpóreo do animal, esse aspecto difere do método realizado no presente estudo, em que usamos a relação esquerdo e direito (E/D) dos membros de cada músculo para determinar a relação de massa entre um músculo sobrecarregado e um músculo não sobrecarregado. Nakano et al. (2009) <sup>(73)</sup>, utilizando laser infravermelho ( $\lambda = 830 \text{ nm}$ ,  $60 \text{ mW}$ ; tamanho de ponto de  $0,3 \text{ cm}^2$ , por  $180 \text{ s}$ ) aplicado de forma local por 14 dias encontrou um aumento da massa muscular em um modelo de atrofia muscular por desuso em ratos.

O estudo de Shen et al. (2013)<sup>(62)</sup>, utilizando FBM vermelha ( $660 \text{ nm}$ ,  $50 \text{ mW}$ ,  $2 \text{ min}$ , durante  $10 \text{ dias}$ ) em um modelo de lesão nervosa

periférica, também encontraram um aumento da massa muscular do músculo gastrocnêmio nos animais que receberam a irradiação.

Com relação a HC, nenhum estudo até o momento investigou o potencial da FBM aplicada de forma local ou vascular sobre o volume de massa muscular utilizando a relação de massa dos membros (E/D), em um músculo sobrecarregado comparando-o a um músculo não sobrecarregado, por isso não foi possível fazer comparações mais próximas do modelo utilizado no presente estudo. Entretanto, um achado interessante no que diz respeito a massa muscular do grupo submetido a FBMV por 14 dias, é que não houve redução da massa muscular nesse grupo, como foi observado nos demais grupos. Este é um dado relevante, visto que poderia indicar um efeito positivo da FBM em manter a massa muscular do músculo sobrecarregado e tratado com FBMV, que nesse estudo se manteve mais próximos aos valores encontrados no grupo controle.

No presente estudo, nos limitamos a investigar o aspecto da relação de massa muscular em um período de até 14 dias após a indução de HC. Assim, não foi possível determinar se a partir desse período poderia ocorrer um aumento na relação de massa muscular no grupo irradiado de forma vascular. Dessa forma, outros estudos poderão investigar a aplicação dessa mesma terapia frente a HC em um período mais longo de sobrecarga, a fim de confirmar uma resposta satisfatória da FBM vascular como terapia coadjuvante para a manutenção e/ou aumento da massa muscular.

Quanto a análise de sensibilidade mecânica, os achados do presente estudo demonstraram uma redução do limiar de sensibilidade em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle após 7 e 14 dias. Não foram encontradas diferenças entre os grupos H e os grupos H + FBML ou H+FBMV em nenhum dos períodos experimentais.

Estudos anteriores utilizaram a FBM aplicada apenas de forma local para avaliar a sensibilidade mecânica em outros modelos experimentais. Andreo et al. (2019)<sup>(25)</sup>, submeteram ratos Wistar ao esmagamento do nervo ciático e em seguida utilizaram a FBM local ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ ,  $10 \text{ J/cm}^2$ ,  $40 \text{ mW}$ , e  $3.2 \text{ J/cm}^2$  de energia total) por 7, 14, 21 e 28 dias aplicada diretamente sobre a lesão nervosa ou sobre o músculo tibial anterior ou ainda sobre o músculo e nervo e assim como demonstrado no presente estudo, também observaram uma redução da

sensibilidade mecânica no grupo irradiado sobre o nervo após uma semana. Os grupos irradiados sobre o músculo ou sobre o músculo e nervo demonstraram medidas aumentadas quando comparados aos outros grupos no período de duas semanas. Já Chen et al. (2014)<sup>(74)</sup> demonstraram que FBM local (808 nm, 190 mW, 8J/cm<sup>2</sup>), foi capaz de promover aumentos tanto do limiar mecânico como do limiar térmico em 4 e 8 dias de irradiações diárias em ratos submetidos a compressão dos gânglios dorsais.

Não há relatos na literatura de estudos avaliando a sensibilidade mecânica associada à FBM em modelos de HC. Contudo, a redução da sensibilidade mecânica encontrada nos grupos submetidos a HC tratados ou não com FBM, pode indicar que diante do processo de HC ocorre um comprometimento da sensibilidade mecânica e que o restabelecimento da sensibilidade próximos ao limiar normal, poderá ocorrer em um intervalo maior de tempo. Assim, um período maior de avaliação da sensibilidade mecânica frente a HC, se faz necessário para estabelecer se após um período maior de HC ocorre de fato o retorno da sensibilidade mecânica, bem como, se a FBM exerce ou não influência como terapia coadjuvante no restabelecimento da sensibilidade mecânica.

Os resultados da análise funcional da marcha, demonstraram que em 7 dias tanto os grupos irradiados quanto o grupo não irradiado apresentaram redução no IFC, IFT e IFP quando comparados ao grupo controle, esse fato foi evidenciado pelo aumento na negatividade do teste. Após 14 dias, o grupo H permaneceu com seus valores negativos elevados quando comparado ao grupo controle. Diferente disso, aos 14 dias os valores dos grupos tratados com FBM mostraram-se sem diferença em relação ao grupo controle no que diz respeito ao aumento na negatividade dos testes, o que indicaria uma possível melhora da capacidade funcional da marcha nos animais tratados com FBM local ou vascular após 14 dias, visto que o grupo H permaneceu com seus valores negativos elevados no mesmo período.

Estudos anteriores utilizando apenas FBM local associada ao teste de capacidade funcional da marcha (IFC), em outros modelos experimentais como o modelo de lesão nervosa periférica, encontraram uma melhora funcional da marcha em vários períodos. Andreo et al. (2019)<sup>(25)</sup>, encontraram uma resposta positiva na capacidade da marcha de ratos com lesão no nervo ciático tratados



com FBM local ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ ,  $10 \text{ J/cm}^2$ ,  $40 \text{ mW}$ , e  $3.2 \text{ J/cm}^2$  de energia total) após duas semanas de irradiações.

Wang et al. (2014)<sup>(75)</sup>, usando FBM infravermelha ( $\lambda = 808 \text{ nm}$ ,  $170 \text{ mW}$ , com  $3$  e  $8 \text{ J/cm}^2$ ) por 20 dias, também em um modelo de lesão nervosa periférica, verificaram uma melhora da recuperação funcional de ratos devido a melhora do IFC, bem como, um aumento da amplitude de movimento no grupo irradiado com  $8 \text{ J}$ .

Um outro estudo aplicou FBM vermelha ( $\lambda = 685 \text{ nm}$ ,  $15 \text{ mW}$ ,  $3 \text{ J/cm}^2$ ) em ratos submetidos ao esmagamento do nervo ciático e observaram uma melhora no padrão do movimento com aumento do IFC 14 e 21 dias após o protocolo de FBM<sup>(76)</sup>. Já Belchior et al. (2009)<sup>(77)</sup>, assim como no presente estudo não encontraram uma melhora significativa no IFC de ratos com lesão nervosa periférica após utilização de FBM vermelha ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ,  $26,3 \text{ mW}$ ,  $4 \text{ J / cm}^2$ ) no período de 7 e 14 dias, mas uma melhora do IFC foi observada após 21 dias.

Outros modelos experimentais também adaptaram e utilizaram o IFC para avaliar a função dos membros posteriores em outras situações de comprometimento do tecido muscular, como por exemplo após lesões musculares ocasionadas por tensão do músculo por estiramento. Ramos et al. 2012<sup>(78)</sup>, induziram o músculo tibial anterior de ratos a tensão muscular por sobrecarga, impondo um peso gradual de 150% do peso corporal do animal por 20 minutos, por duas vezes e aplicaram FBML infravermelha ( $810 \text{ nm}$ ,  $3,57 \text{ W cm}$ ) 2. com doses de  $1 \text{ J / cm}^2$ ,  $3 \text{ J / cm}^2$ ,  $6 \text{ J / cm}^2$  e  $9 \text{ J / cm}^2$  e tempos de irradiação de 10, 30, 60 e 90 segundos, 1h após a tensão muscular, aplicada sobre o ventre do músculo tibial anterior. Os animais foram submetidos ao IFC após 6, 12 e 24h. Os autores verificaram que a FBML com doses variando de  $1-9 \text{ J / cm}^2$ , melhorou o IFC 12 h após a tensão muscular.

De Paiva et al. 2013<sup>(79)</sup> submeteu ratos Wistar a tensão muscular por sobrecarga do músculo tibial anterior, em seguida realizaram o protocolo de FBML ( $810 \text{ nm}$ ,  $100 \text{ mW}$ ,  $3 \text{ J / cm}^2$ ) 1 h após a lesão. Ao avaliarem o IFC dos animais, observaram uma melhora nos grupos tratados com FBML.

No presente estudo, avaliamos a interação da FBM associada ao processo de HC em um período de até 14 dias, e ao final desse período foi possível observar um aumento permanente indicativo de piora no IFC, IFT e

IFP no grupo H. Os grupos submetidos a FBM embora não apresentaram uma redução na negatividade do teste, também não apresentaram um aumento, o que indicaria que uma melhora gradativa poderá ocorrer em grupos tratados com FBM por períodos mais longos, como em um período de 21 dias. Esse questionamento poderá ser melhor elucidado em um estudo futuro. Contudo, o fato de observarmos no presente estudo que os grupos tratados com FBM não apresentaram um aumento na negatividade do teste funcional após 14 dias quando comparados ao grupo controle, é um indicativo de que tanto a FBM local quanto a FBM vascular podem favorecer a melhora da capacidade funcional de músculos sobrecarregados e irradiado por 14 dias ou mais.

Até o momento não foi encontrado na literatura registro de estudo que avaliou a capacidade modulatória da FBM vascular, nem tão pouco que comparou a melhor resposta efetiva entre o protocolo de FBM aplicado de forma vascular ou local sobre um músculo submetido a sobrecarga funcional. Assim, esses novos achados podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a FBM em ambas as formas de aplicação, bem como auxiliar na decisão de qual desses protocolos mostram-se como a melhor escolha terapêutica a ser explorada como possibilidade de intervenção nos acometimentos das desordens musculares ocasionadas por sobrecarga muscular.

## **6. CONCLUSÃO**

---

A FBM induziu ao aumento da AST e do diâmetro da fibra muscular e garantiu a manutenção da massa do músculo plantar durante o processo de HC, sendo esses efeitos potencializados na sua forma sistêmica de aplicação (FBMV). Além disso, a FBM demonstrou efeitos positivos no que diz respeito aos aspectos funcionais da marcha, restabelecendo o índice normal de funcionalidade próximos aos encontrados no grupo controle.

### **Limitações do estudo**

Neste estudo, nos limitamos a avaliar os aspectos funcionais do músculo plantar frente ao processo hipertrofia compensatória em um período de até 14 dias. Assim, os achados referentes aos aspectos funcionais durante a hipertrofia compensatória como a razão de massa muscular, sensibilidade mecânica e capacidade funcional da marcha, poderão ser melhores esclarecidos em estudos posteriores que incluam um período de sobrecarga muscular maior do que o estabelecido no presente estudo. Além disso, a utilização da FBMV é uma terapêutica inovadora, porém recente no que diz respeito a sua capacidade de modulação do tecido muscular esquelético. Dessa forma, outros estudos deverão ser realizados a fim de confirmarem os achados do presente estudo e preencher a lacuna científica no que diz respeito aos efeitos dessa terapia frente as diversas alterações a que o músculo esquelético pode ser exposto.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Figueiredo VC. Revisiting the roles of protein synthesis during skeletal muscle hypertrophy induced by exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2019; 1;317(5):709-718.
2. Feng X, Naz F, Juan AH, Dell'Orso S, Sartorelli V. Identification of Skeletal Muscle Satellite Cells by Immunofluorescence with Pax7 and Laminin Antibodies. *J Vis Exp.* 2018;(134):57212.
3. Terena SML, Fernandes KPS, Kalil S, Alves AN, Mesquita Ferrari RA. Effects of lowlevel laser in the morphology of the skeletal muscle fiber during compensatory hypertrophy in plantar muscle of rats. *Prog Biomed Opt Imaging - Proc SPIE.* 2015; 9531:1–7
4. Wackerhage H, Schoenfeld BJ, Hamilton DL, Lehti M, Hulmi JJ. Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise. *J Appl Physiol.* 2019; 1;126(1):30-43.
5. Terena SML, Fernandes KPS, Bussadori SK, Deana AM, Mesquita-Ferrari RA. Systematic review of the synergist muscle ablation model for compensatory hypertrophy. *Rev Assoc Med Bras.* 2017;63(2):164–172.
6. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve.* 2011; 44 (3): 318-331.
7. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004 Apr;84(2):649-98.
8. Franchi M, Triré A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V et al. Collagen structure of tendon relates to function. *The Scientific World Journal.* 2007; 7: 404-420.
9. Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM et al. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol.* 2007;1;582(3):1303-1316.

10. Alves AN, Fernandes KPS, Melo CA V, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF et al. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):813–821.
11. de Melo CAV, Alves AN, Terena SML, Fernandes KPS, Nunes FD, da Silva D de FT, et al. Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle. *Lasers Med Sci.* 2016;31(3):531-538.
12. Ribeiro BG, Alves AN, Santos LADD, Fernandes KPS, Cantero TM, Gomes MT et al. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers Surg Med.* 2015;47(7):571–578.
13. Martinelli A, Andreo L, Alves AN, Terena SML, Santos TC, Bussadori SK et al. Photobiomodulation modulates the expression of inflammatory cytokines during the compensatory hypertrophy process in skeletal muscle. *Lasers Med Sci.* 2021;36(4):791-802.
14. Terena SML, Fernandes KPS, Bussadori SK, Brugnera Junior A, de Fátima Teixeira da Silva D, Magalhães EMR, et al. Infrared Laser Improves Collagen Organization in Muscle and Tendon Tissue During the Process of Compensatory Overload. *Photomed Laser Surg.* 2018;36(3):130–136.
15. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports.* 2000; 10(6): 312-320.
16. Nishimura T, Nakamura K, Kishioka Y, Kato-Mori Y, Wakamatsu J, Hattori A. Inhibition of matrix metalloproteinases suppresses the migration of skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008;29(1):37-44.
17. Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle.* 2011 May 4;1(1):21.
18. Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr.* 2009 Oct-Dec;3(4):337-341.

19. Parvaresh KC, Huber AM, Brochin RL, Bacon PL, McCall GE, Huey KA et al. Acute vascular endothelial growth factor expression during hypertrophy is muscle phenotype specific and localizes as a striated pattern within fibres. *Exp Physiol*. 2010; 95 (11):1098–1106.
20. Schuenke MD, Brooks NE, Hikida RS. Interactions of aging, overload and creatine supplementation in rat plantaris muscle. *J Aging Research*. 2011; ID393416.
21. Gordon BS, Delgado Dias DC, White JP, Carson JÁ, Kostec MC. Six1 and Six1 cofactor expression is altered during early skeletal muscle overload in mice. *J Physiol Sci*. 2012; 62 (5): 393-401.
22. Heikkinen J, Lantto I, Piilonen J, Flinkkilä T, Ohtonen P, Siira P et al. Tendon length, calf muscle atrophy, and strength deficit after acute Achilles tendon rupture: long-term follow-up of patients in a previous study. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2017;99(18):1509-1515.
23. Jensen L, Jørgensen H, Bech RD, Frandsen U, Schrøder HD. Skeletal muscle remodelling as a function of disease progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:5930621.
24. Takasaki I, Andoh T, Shiraki K, Kuraishi Y. Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. *Pain*. 2000; 86(1-2):95-101.
25. Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, de Matos PRV, Sousa PB, de Alcântara Araújo Amorim WW et al. Effects of Photobiomodulation on Functionality in Wistar Rats with Sciatic Nerve Injury. *Photochem Photobiol* 2019; 95(3):879-885.
26. de Medinacelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neuro*. 1982; 77(3): 634-643.

27. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Function evaluation of complete sciatic, peroneal e posterior tibial nerve lesion in the rat. *Plastic and Reconst. Surgery*. 1989; 83(1): 129-138.
28. Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 72:19-32.
29. Hernández-Hernández JM, García-González EG, Brun CE, Rudnicki MA. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 72:10-18.
30. Rayagiri SS, Ranaldi D, Raven A, Mohamad Azhar NIF, Lefebvre O, Zammit PS, et al. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nat Commun*. 2018;9(1):1075.
31. Ganassi M, Badodi S, Wanders K, Zammit PS, Hughes SM. Myogenin is an essential regulator of adult myofibre growth and muscle stem cell homeostasis. *Elife*. 2020; 9:e60445.
32. Zhao Y, Chen M, Lian D, Li Y, Li Y, Wang J et al. Non-Coding RNA Regulates the Myogenesis of Skeletal Muscle Satellite Cells, Injury Repair and Diseases. *Cells*. 2019;8(9):988.
33. Ohno Y, Ando K, Ito T, Suda Y, Matsui Y, Oyama A et al. Lactate Stimulates a Potential for Hypertrophy and Regeneration of Mouse Skeletal Muscle. *Nutrients*. 2019;11(4):869.
34. Bazgir B, Fathi R, Rezazadeh Valojerdi M, Mozdziak P, Asgari A. Satellite cells contribution to exercise mediated muscle hypertrophy and repair. *Cell J*. 2017;18(4):473–484.
35. Sampath SC, Sampath SC, Ho ATV, Corbel SY, Millstone JD, Lamb J et al. Induction of muscle stem cell quiescence by the secreted niche factor Oncostatin M. *Nature commun*. 2018 v. 9(1):1531.

36. Bruusgaard JC, Johansen IB, Egner IM, Rana ZA & Gundersen K. Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107, 15111–15116.
37. Cramer RM, Langberg H, Magnusson P, Jensen CH, Schroder HD, Olesen JL, Suetta C, Teisner B & Kjaer M. Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *J Physiol*. 2004; 558, 333–340.
38. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*. 2013; 280: 4294–314.
39. Alves Souza RW, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, Piedade WP, Rocha Campos GE, Dal-Pai-Silva M. Resistance training with excessive training load and insufficient recovery alters skeletal muscle mass-related protein expression. *J Strength Cond Res*. 2014;28(8):2338-2345.
40. Ishido M, Kami K, Masuhara M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. *Acta Physiol Scand*. 2004;180 (3):281-289.
41. Aguiar A e Danilo H. Aguiar. "Plasticidade muscular no exercício físico." *Rev. bras. ciênc. mov*. 2009; 104-113.
42. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol*. 2008;84(5):1091-1099.
43. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*. 2013; 32 (1) :41-52.
44. Alves AN, Ribeiro BG, Fernandes KP, Souza NH, Rocha LA, Nunes FD et al. Comparative effects of low-level laser therapy pre- and post-injury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci*. 2016;31(4):679-685.



45. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA, Da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VCS et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011;26(3):335–340.
46. Fernandes KPS, Ferrari RM, Bussadori SK, Franca CM. Vascular Photobiomodulation. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2021 Mar; 39 (3):143-144.
47. Momenzadeh S, Abbasi M, Ebadifar A, Aryani M, Bayrami J, Nematollahi F. The intravenous laser blood irradiation in chronic pain and fibromyalgia. *J Lasers Med Sci.* 2015;6(1):6-9.
48. Mikhaylov VA. The use of Intravenous Laser Blood Irradiation (ILBI) at 630-640 nm to prevent vascular diseases and to increase life expectancy. *Laser Ther.* 2015; 24(1):15-26.
49. Moskvina SV. Low-Level Laser Therapy in Russia: History Science and Practice. *J Lasers Med Sci.* 2017;8(2):56-65.
50. Lopez TCC, Malavazzi TCDS, Rodrigues MFSD, Bach EE, Silva DT, Hi EMBet al. Histological and biochemical effects of preventive and therapeutic vascular photobiomodulation on rat muscle injury. *J Biophotonics.* 2022; 15 (5): e202100271.
51. Ramos FS, Maifrino LBM, Alves S, da Costa Aguiar Alves B, Perez MM, Feder D et al. The effects of transcutaneous low-level laser therapy on the skin healing process: an experimental model. *Lasers Med Sci.* 2018;33(5):967-976.
52. Wang H, Deng J, Tu W, Zhang L, Chen H, Wu X, Li Y et al. The hematologic effects of low intensity 650 nm laser irradiation on hypercholesterolemia rabbits. *Am J Transl Res.* 2016; 15;8(5):2293-300.
53. Kilik R, Bober P, Ropovik I, Beňačka R, Genči j, nečas A et al. Proteomic analysis of plasma proteins after low-level laser therapy in rats. *Physiol. Res.* 2019; 68(Suppl. 4): S399-S404.

54. Derkacz A, Protasiewicz M, Poręba R, Doroszko A, Andrzejak R. Effect of the intravascular low energy laser illumination during percutaneous coronary intervention on the inflammatory process in vascular wall. *Lasers Med Science*. 2013; 28(3) 763–768.
55. Huang SF, Tsai YA, Wu SB, Wei YH, Tsai PY, Chuang TY. Effects of intravascular laser irradiation of blood in mitochondria dysfunction and oxidative stress in adults with chronic spinal cord injury. *Photomed Laser Surg*. 2012;30(10):579-586.
56. Kazemikhoo N, Sarafnejad AF, Ansari F, Mehdipour P. Modifying effect of intravenous laser therapy on the protein expression of arginase and epidermal growth factor receptor in type 2 diabetic patients. *Lasers Med Sci*. 2016;31(8):1537-1545.
57. McCarthy JJ, Mula J, Miyasak M, Erfani R, Garrison K, Farooki AB et al. Effective fiber hypertrophy insatellite cell-depleted skeletal muscle. *Development*. 2011;138 (17): 3657-66.
58. Roshchina AA, Nikolaeva SS, Kozhura VL, Teselkin YO, Babenkova IV, Yakovleva LV et al. Water status and LPO in rat tissues during massive blood loss and irradiation with He-Ne laser. *Bull Exp Biol Med*. 2003;135(2):136-138.
59. Yamaikina IV, Mansurov VA, Gorbunova NB, Batai LE, Ulashchik VS, Orlovichd VA. Rheology dynamics of the blood and plasma of rats after transdermal laser irradiation of the tail vein in the infrared range. *J Eng Phys Thermophy*. 2012;85(3):655-61.
60. Tomimura S, Silva BP, Sanches IC, Canal M, Consolim-Colombo F, Conti FF et al. Hemodynamic effect of laser therapy in spontaneously hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(2):161-164.
61. da Silva JGF, Dos Santos SS, de Almeida P, Marcos RL, Lino-Dos-Santos-Franco A. Effect of systemic photobiomodulation in the course of acute lung injury in rats. *Lasers Med Sci*. 2021;36(5):965-973.

62. Shen CC, Yang YC, Huang TB, Chan SC, Liu BS. Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats with low-level laser phototherapy. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(10):2763-2777.
63. Greising SM, Corona BT, Call JA. Musculo skeletal Regeneration, Rehabilitation, and Plasticity Following Traumatic Injury. *Int J Sports Med*. 2020;41(8):495-504.
64. Abreu P, Leal-Cardoso JH, Ceccatto VM, Hirabara SM. Regulation of muscle plasticity and trophism by fatty acids: A short review. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2017;63(2):148-155.
65. Konopka AR, Harber MP. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*. 2014;42(2):53-61.
66. Damas F, Libardi CA, Ugrinowitsch C. The development of skeletal muscle hypertrophy through resistance training: the role of muscle damage and muscle protein synthesis. *Eur J Appl Physiol*. 2018;118(3):485-500.
67. Wirth SH, Andronic O, Aregger F, Jungwirth-Weinberger A, Jentzsch T, Hecker A. Flexor hallucis longus hypertrophy secondary to Achilles tendon tendinopathy: an MRI-based case-control study. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2021;31(7):1387-1393.
68. Ichinose T, Yamamoto A, Kobayashi T, Shitara H, Shimoyama D, Iizuka H et al. Compensatory hypertrophy of the teres minor muscle after large rotator cuff tear model in adult male rat. *J Shoulder Elb Surg*. 2016; 25:316–321.
69. Nakada S, Ogasawara R, Kawada S, Maekawa T, Ishii N. Correlation between Ribosome Biogenesis and the Magnitude of Hypertrophy in Overloaded Skeletal Muscle. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147284.
70. Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm<sup>2</sup>) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci*. 2015;30(3):1047-1052

71. Andreo L, Ribeiro BG, Alves AN, Martinelli ASA, Soldera CB, Horliana ACRT et al. Effects of Photobiomodulation with Low-level Laser Therapy on Muscle Repair Following a Peripheral Nerve Injury in Wistar Rats. *Photochem Photobiol.* 2020;96(5):1124-1132.
72. de Brito A, Alves AN, Ribeiro BG, Barbosa DVDE, Magalhaes EMR, Fernandes KPS et al. Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. *Lasers Med Sci* 2018;33 (3):513–521.
73. Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Yoshimura T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* 2009 Sep;94(9):1005-15.
74. Chen YJ, Wang YH, Wang CZ, Ho ML, Kuo PL, Huang MH et al. Effect of low level laser therapy on chronic compression of the dorsal root ganglion. *PLoS One.* 2014;9(3):e89894.
75. Wang CZ, Chen YJ, Wang YH, Yeh ML, Huang MH, Ho ML et al. Low-level laser irradiation improves functional recovery and nerve regeneration in sciatic nerve crush rat injury model. *PLoS One.* 2014;9(8):e103348.
76. Takhtfooladi MA, Jahanbakhsh F, Takhtfooladi HA, Yousefi K, Allahverdi A. Effect of low-level laser therapy (685 nm, 3 J/cm<sup>2</sup>) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci.* 2015;30(3):1047-1052.
77. Belchior AC, dos Reis FA, Nicolau RA, Silva IS, Perreira DM, de Carvalho Pde T. Influence of laser (660 nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):893-899.
78. Ramos L, Leal Junior EC, Pallotta RC, Frigo L, Marcos RL, de Carvalho MH, Bjordal JM, Lopes-Martins RÁ. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: effects on functional outcomes. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(1):154-160

79. de Paiva Carvalho RL, Leal-Junior EC, Petrellis MC, Marcos RL, de Carvalho MH, De Nucci G, Lopes-Martins RA. Effects of low-level laser therapy (LLLT) and diclofenac (topical and intramuscular) as single and combined therapy in experimental model of controlled muscle strain in rats. *Photochem Photobiol.* 2013; 89(2):508-512

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo A. Checklist

NOTE: Please save this file locally before filling in the table, DO NOT work on the file within your internet browser as changes will not be saved. Adobe Acrobat Reader (available free here) is recommended for completion.



## The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

### The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting	
Study design	1 For each experiment, provide brief details of study design including:		
	a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).	3.2 3.1	
Sample size	2 a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done.	3.1 and 3.2 Not reported	
	Inclusion and exclusion criteria	3 a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i> . If no criteria were set, state this explicitly. b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. c. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group.	3.1 Not reported 3.9
Randomisation		4 a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	3.2 3.2
		Blinding	5 Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).
Outcome measures	6 a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	2 2	
	Statistical methods	7 a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	3.14 3.14
Experimental animals		8 a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	3.1 3.1
	Experimental procedures	9 For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:	3
a. What was done, how it was done and what was used.		3	
b. When and how often.		3	
c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures).		3 3	
Results	10 For each experiment conducted, including independent replications, report:	3.14	
	a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). b. If applicable, the effect size with a confidence interval.	not reported	

## The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
<b>Abstract</b>	11 Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.	Page 9
<b>Background</b>	12 a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach. b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.	1.2 1.2
<b>Objectives</b>	13 Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	2
<b>Ethical statement</b>	14 Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.	3
<b>Housing and husbandry</b>	15 Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	3.1
<b>Animal care and monitoring</b>	16 a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress. b. Report any expected or unexpected adverse events. c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this.	3.4 Not reported Not reported
<b>Interpretation/ scientific implications</b>	17 a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.	4 6
<b>Generalisability/ translation</b>	18 Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).	Not reported
<b>Protocol registration</b>	19 Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.	Not reported
<b>Data access</b>	20 Provide a statement describing if and where study data are available.	Not reported
<b>Declaration of interests</b>	21 a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated. b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study.	6 4

## 8.2. Anexo B. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Experimentação Animal



Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO COMPARATIVO DA FOTOBIMODULAÇÃO LOCAL E SISTÊMICA SOBRE O MÚSCULO PLANTAR DE RATOS DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA", protocolada sob o CEUA nº 4624150520 (ID 000225), sob a responsabilidade de **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari e equipe; Andréia Martinelli de Siqueira Araujo** - 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 19/05/2020.

We certify that the proposal "COMPARATIVE EFFECT OF LOCAL AND SYSTEMIC PHOTOBIMODULATION ON THE PLANTAR MUSCLE OF RATS DURING THE COMPENSATORY HYPERTROPHY PROCESS", utilizing 85 Heterogenics rats (85 males), protocol number CEUA 4624150520 (ID 000225), under the responsibility of **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari and team; Andréia Martinelli de Siqueira Araujo** - 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 05/19/2020.

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

Vigência da Proposta: de **6//2020** a **12/2021**

Área: **Ciências da Reabilitação**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 12 semanas**

N: **85**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **240 a 280 g**

Local do experimento: Biotério da Universidade Nove de Julho. Rua Vergueiro, 235/249 - Liberdade, São Paulo - SP.

São Paulo, 10 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