



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

Valéria de Araújo Ferreira Gregio de Souza

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA AO TREINAMENTO
AQUÁTICO DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA
DO MÚSCULO PLANTAR EM RATOS WISTAR**

**SÃO PAULO
2022**

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

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA AO TREINAMENTO
AQUÁTICO DURANTE O PROCESSO DE HIPERTROFIA COMPENSATÓRIA
DO MÚSCULO PLANTAR EM RATOS WISTAR**

Dissertação de mestrado apresentada
como pré requisito para obtenção do
título de mestre em Ciências da
Reabilitação da Universidade Nove de
Julho.

Orientadora Prof^a. Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

**SÃO PAULO
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Valéria de Araújo Ferreira Gregio de.

Efeito da fotobiomodulação associada ao treinamento aquático durante o processo de hipertrofia compensatória do músculo plantar em ratos wistar. / Valéria de Araújo Ferreira Gregio de Souza. 2022.

74 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2022.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

1. Fotobiomodulação. 2. Laser em baixa intensidade. 3. Hipertrofia. 4. Músculo esquelético. 5. Exercícios aquáticos.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título

CDU 615.8

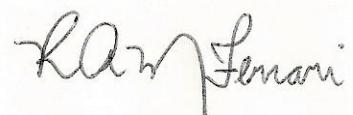
São Paulo, 19 de dezembro de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): VALÉRIA DE ARAÚJO FERREIRA GREGIO DE SOUZA

Título da Dissertação: "Efeito da Fotobiomodulação Associada ao Exercício de Resistência em Meio Aquático Durante o Processo de Hipertrofia Compensatória do Músculo Plantar de Ratos Wistar"

Presidente: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA-FERRARI



Membro: PROFA. DRA. SANDRA KALIL BUSSADORI



Membro: PROFA. DRA. MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA



DEDICATÓRIA

À Deus, por ser o meu refúgio e fortaleza.

À minha família marido e filhos, pela compreensão e apoio quando necessitei ausentar-me, por diversas vezes em momentos importantes. E pelo incentivo para que eu não desistisse, apesar das dificuldades. **Filhos, meus amores Matheus e Laura.**

Aos meus pais, pois tenho convicção que eles são a minha referência de vida, amo muito vocês, Moisés e Nice.

Ao meu “paidastro”, por ajudar inúmeras vezes com os netos, e pelo incentivo, Eduardo.

AGRADECIMENTOS

À Deus sem Deus jamais conseguiria chegar até aqui.

A professora e orientadora Prof^a. Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, por ser uma pessoa muito simpática e disposta a ajudar com respeito e compreensão todas as vezes que necessitei.

A minha amiga Andréia Martinelli, admiro tantas coisas em você, a sua fé a sua dedicação e comprometimento, com tudo o que se propõe a fazer. E sou grata à Deus por sua amizade, colaboração, palavras de apoio e motivação nessa etapa tão importante na minha vida.

A minha amiga Tainá Santos, tão jovem e com uma expertise enorme acadêmica, tenho muita admiração por você e gratidão nas etapas importantes desse trabalho.

Meu colega Lucas Andreo gratidão por ter uma participação ímpar nesse trabalho, sempre solicto aos meus pedidos de ajuda.

As minhas irmãs de fé as orações me mantiveram em pé, principalmente quando quase desisti, agradeço as orações.

Aos funcionários da Uninove portaria, laboratório e Biotério, sempre solícitos, o que facilitou a realização deste trabalho.

A Universidade Nove de Julho (UNINOVE) tenho orgulho por fazer parte como aluna, há alguns anos.

A CAPES pela bolsa de estudos, sem a bolsa não seria possível a realização desse trabalho.

RESUMO

A hipertrofia compensatória (HC) ocorre devido à sobrecarga mecânica imposta ao músculo promovendo o aumento no tamanho de suas fibras. A fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado resultados positivos em modular citocinas envolvidas na adaptação muscular necessária durante a HC promovendo o aumento da área de secção transversa e melhorando a organização do colágeno. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do treinamento aquático (TA) e sua associação com FBM na síntese de citocinas e aspectos morfológicos do músculo plantar durante processo de HC em ratos Wistar. Foram utilizados 26 ratos Wistar machos divididos em 3 grupos: (1) Controle Hipertrofia compensatória (HC) (n=6 animais; n=12 amostras - cirurgia bilateral); (2) HC+TA n=20 amostras e (3) HC+TA + FBM local (FBML) (n=20). Antes do procedimento cirúrgico os animais foram submetidos a adaptação em TA por 5 dias de forma progressiva dia 1- 15min, dia 2- 30min, dia 3- 45min, 60min nos dois dias seguintes. A HC foi induzida pela ablação bilateral dos músculos sinergistas do músculo plantar músculos gastrocnêmio lateral e medial do sóleo. A FBM foi realizada com LBI AsGaAl 780 nm, 10 J/cm², 40 mW, 10 s, 8 pontos, 3.2 J de energia total. Os animais realizaram o TA em tanques de cloreto de polivinila (PVC) 35cmx30cmx30cm com capacidade de 20L e temperatura média de 31+- 1°C com duração de 60 min/dia, 5 vezes por semana, durante os 7 e 14 dias. Após esse período, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos e os músculos plantares foram removidos e utilizados para análise do peso em relação ao peso corporal dos animais, análise de expressão proteica de TNF-α por ELISA e para análise de aspectos morfológicos incluindo o diâmetro das fibras e área de secção transversa (AST) por técnica de histologia com coloração H&E. Os dados foram submetidos a análise estatística e expressos em média e erro padrão da média sendo a comparação entre os grupos realizada pela ANOVA e pós-Hoc Tukey utilizando o programa Grap Pad Prism 5.00 (Califórnia). Os resultados de massa muscular em relação ao peso corporal dos animais demonstraram que não houve diferença entre os grupos HC, HC+TA e grupo HC + TA + FBM em nenhum dos períodos experimentais. A análise de expressão proteica por ELISA demonstrou que em 7 dias houve uma redução nos níveis de TNF-α nos grupos HC+TA+FBM quando comparado ao grupo Controle HC. Não houve diferença entre os grupos HC+ TA e grupo HC+TA +FBM. Após 14 dias não foram encontradas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. Os resultados da análise da AST das fibras musculares demonstraram maiores valores de área após 7 dias no grupo HC+ TA+FBM, quando comparado ao grupo HC+TA e menores valores de área no grupo HC+TA quando comparado ao grupo Controle HC. Após 14 dias maiores valores de área foi observado no grupo HC+TA+FBM quando comparado ao grupo HC + TA. A análise quantitativa do diâmetro das fibras, demonstrou que após 7 dias não houve diferença entre os grupos experimentais e após 14 dias houve um aumento nos grupos HC+TA e HC+TA+ FBM quando comparados ao grupo HC. Em conclusão, a associação do TA associado a FBM modulou a expressão de TNF -α e aumentou a AST e o diâmetro das fibras musculares. Além disso, a TA realizado sem a associação da FBM, também promoveu o aumento do diâmetro das fibras.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; laser em baixa intensidade; hipertrofia; músculo esquelético, exercícios aquáticos, exercícios de resistência.

ABSTRACT

Compensatory hypertrophy (CH) occurs when a mechanical overload is imposed on the muscle promoting an increase in the size of its fibers. The photobiomodulation (PBM) with low intensity laser (LLLT) showed positive results in modulating cytokines involved in muscle adaptation necessary during CH promoting an increase in cross-sectional area and improving collagen organization. The aim of this study was to evaluate the effects of aquatic training and its association with PBM on cytokine synthesis and morphological aspects of the plantar muscle during the CH process in Wistar rats. Twenty-six male Wistar rats divided into 3 groups were used: (1) Control Compensatory Hypertrophy (CH) n=6 animals; n=12 samples because the surgery is bilateral); (2) Hypertrophy + Aquatic Training (CH+AT) n=20 samples and (3) Hypertrophy + Aquatic Training + PBM (CH+AT+PBM) (n=20). Before the surgical procedure the animals underwent adaptation in AT for 5 days progressively day 1- 15min, day 2-30min, day 3- 45min, 60min the next two days. CH was induced by bilateral ablation of the plantar muscle synergist muscles lateral gastrocnemius and medial soleus. PBM was performed with AsGaAl 780 nm, 10 J/cm², 40 mW, 10 s, 8 points, 3.2 J total energy. The animals performed the swimming exercises in PVC polyvinyl chloride tanks 35cm x 30cm x 30cm with a capacity of 20L and an average temperature of 31+- 1°C. The animals swam for 60 min/day, 5 times a week, during the 7 and 14 days. After this period, the animals were euthanized by anesthetic overdose and the plantar muscles were removed and used for weight analysis in relation to the animals' body weight, protein expression analysis of TNF -α by ELISA and pananalysis of morphological aspects including fiber diameter and cross-sectional area (CSA) by histology technique with H&E staining. Data were tested for normality by Kolmogorov-Smirnov test and expressed as mean and standard error of the mean. The comparison between groups was performed by ANOVA. The Tukey contrast (post hoc) test was used. All data were analyzed using the program Grap Pad Prism 5.00 (California) The results of the muscle mass analysis in relation to the animals' body weight showed that there was no difference between the CH, CH+AT and CH + AT + PBM groups in any of the experimental periods. The protein expression analysis by ELISA demonstrated that at 7 days there was a reduction in TNF-α levels in the CH+AT+PBM groups when compared to the CH Control group. There was no difference between the CH+AT group and the CH+AT+PBM group. After 14 days, no statistical differences were found between the different experimental groups. The results of the CSA analysis of the muscle fibers showed higher area values after 7 days in the CH+AT+PBM group, when compared to the CH+AT group CSA and smaller in area in the CH+AT group when compared to the Control CH group. After 14 days, greater area values were observed in the CH+AT+PBM group when compared to the CH + AT group. The quantitative analysis of fiber diameter showed that after 7 days there was no difference between the experimental groups and after 14 days there was an increase in the CH+AT and CH+AT+PBM groups when compared to the CH group. In conclusion, TA associated with PBM modulated the expression of TNF -α and increased CSA and muscle fiber diameter. In addition, AT performed without the association of PBM, also promoted the increase in fiber diameter.

Keywords: Photobiomodulation; low intensity laser; hypertrophy; skeletal muscle; aquatic exercises; resistance exercises.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| JUSTIFICATIVA..... | 21 |
| 2. OBJETIVO | 23 |
| Geral | 23 |
| Específico | 23 |
| 3. METODOLOGIA | 24 |
| 3.1 Animais | 24 |
| 3.2 Grupos experimentais..... | 24 |
| 3.3 Fluxograma do estudo..... | 25 |
| 3.4 Procedimento Cirúrgico | 26 |
| 3.5 Protocolo de treinamento aquático..... | 28 |
| 3.6 Imagem do protocolo treinamento aquático..... | 29 |
| 3.7 Protocolo fotobiomodulação muscular..... | 29 |
| 3.8 Procedimento de eutanásia e coleta do material | 31 |
| 3.9 Análise da massa muscular | 31 |
| 3.10 Análise de expressão proteica por ELISA..... | 32 |
| 3.11 Análise de histologia por HE do tecido muscular..... | 32 |
| 3.12 Análise de Resultados..... | 33 |
| 4. RESULTADOS | 34 |
| 4.1 Artigo 1. A associação da fotobiomodulação e do treinamento aquático reduzem a expressão de TNF- α e aumentam a área da fibra muscular durante o processo de HC em ratos Wistar..... | 34 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 59 |
| 6. CONCLUSÃO | 65 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA..... | 66 |
| 8. ANEXOS..... | 72 |
| 8.1 ANEXO A. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Experimentação Animal..... | 72 |
| 8.2 ANEXO B. Checklist..... | 73 |
| Apêndice. Comprovante de submissão de artigo científico à Revista <i>Conscientiae Saúde</i> | 75 |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Descrição dos mecanismos celulares e moleculares durante o processo de hipertrofia..... | 16 |
| Figura 2: Fluxograma estudo..... | 25 |
| Figura 3: Procedimento cirúrgico de indução de HC por meio de ablação dos músculos sinergistas (gastrocnêmio e sóleo) do músculo plantar..... | 27 |
| Figura 4: Imagem do Protocolo do Treinamento Aquático..... | 29 |
| Figura 5: Procedimento de irradiação com LBI aplicado ao redor da sutura na região da pele que recobre o músculo plantar..... | 30 |
| Figura 6: Valores Médios \pm erro padrão da média da massa muscular plantares em relação ao peso corporal dos animais dos diferentes grupos, no período experimental de 7 e 14 dias. (ANOVA/Tukey) | 56 |
| Figura 7: Valores Médios \pm erro padrão da expressão proteica da citocina TNF- α nos diferentes grupos, no período experimental de 7 e 14 dias. (ANOVA/Tukey) *p< 0,05 vs controle HC. | 56 |
| Figura 8: Cortes histológicos transversais dos músculos plantares corados com hematoxilina e eosina (400x) do grupo controle HC; grupo HC + TA e grupo HC + TA + FBM..... | 57 |
| Figura 9: Valores Médios \pm erro padrão da área de secção transversa (AST) nos diferentes grupos, no período experimental de 7 e 14 dias; (ANOVA /Tukey) | |

*p< .0,05 vs controle HC; ***p< 0,001 vs HC+TA e **p< 0,01 vs HC+TA.....58

Figura 10: Valores Médios ± erro padrão do diâmetro das fibras nos diferentes grupos, no período experimental de 7 e 14 dias. (ANOVA/Tukey)**p< .0,01 vs controle HC.....58

Tabela 1: Descrição dos parâmetros utilizados para a FBML.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--------------------------------------------|
| ANOVA | Análise de Variância |
| AST | Área de secção transversa |
| CS | Células satélites |
| FBM | Fotobiomodulação |
| FBML | Fotobiomodulação Local |
| FBMV | Fotobiomodulação Vascular |
| HC | Hipertrofia Compensatória |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| IL1-β | Interleucina Beta |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| LBI | Laser de Baixa Intensidade |
| LNP | Lesão Nervosa Periférica |
| LM | Lesão Medular |
| MEC | Matriz Extracelular |
| TGF-β | Fator de Transformação de Crescimento Beta |
| mW | Miliwatts |
| Nm | Nanômetro |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| °C | graus Celsius |
| cm² | Centímetro Quadrado |
| J | Joule |

| | |
|---------------|--------------------------------------------|
| μ | Micrometro |
| G | Gram |
| Mg | Miligram |
| λ | Comprimento de Onda |
| μg | Microgram |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| mL | Mililitro |
| % | Porcentagem |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| kg | kilogram |
| L | Litro |
| min | Minutos |
| h | Hora |
| seg. | Segundo |
| pH | Ácido Hidrogeniônico |

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é um tecido com grande plasticidade caracterizada pela habilidade de se adaptar a estímulos ambientais externos¹⁻². O tecido muscular esquelético é composto por células musculares advindas da diferenciação de células precursoras em miócitos e que se fundiram formando as fibras musculares multinucleadas responsáveis por produzirem força e movimento durante o processo de contração muscular³.

Considerando o aspecto funcional, as fibras musculares podem ser classificadas como rápidas ou fibras do tipo II (IIa, IIb, IIx/IId) e as lentas que são representadas pelas fibras do tipo I.

As células satélites (CS), são células tronco mononucleares, fusiformes, localizadas paralelamente nas fibras musculares do músculo esquelético entre o sarcolema e a lâmina basal. Na literatura, desde sua descoberta há mais de cinco décadas aproximadamente, estuda-se qual a sua contribuição para a manutenção da massa muscular, regeneração e hipertrofia do músculo esquelético⁶. No que diz respeito a hipertrofia, as CS são responsáveis por contribuir diretamente com o aumento da massa muscular. Dessa forma, frente a um estímulo de sobrecarga por exercício ou após um dano muscular, essas células são ativadas e iniciam os eventos de proliferação, diferenciação, migração e fusão com a fibra adulta ou formação de uma nova fibra muscular^{1,6-7}. Assim o processo de hipertrofia da fibra muscular esquelética decorre do aumento da concentração das células satélites CS nas fibras⁵.

A hipertrofia do músculo esquelético pode envolver os seguintes mecanismos: (1) ativação das CS em respostas a um estímulo agudo, como no caso da ablação sinérgica de determinados músculos ou (2) a realização de exercícios excêntrico de alto impacto⁸. É importante destacar que estas são situações relacionados a ocorrência de micro lesões próprias do processo adaptativo da fibra muscular.

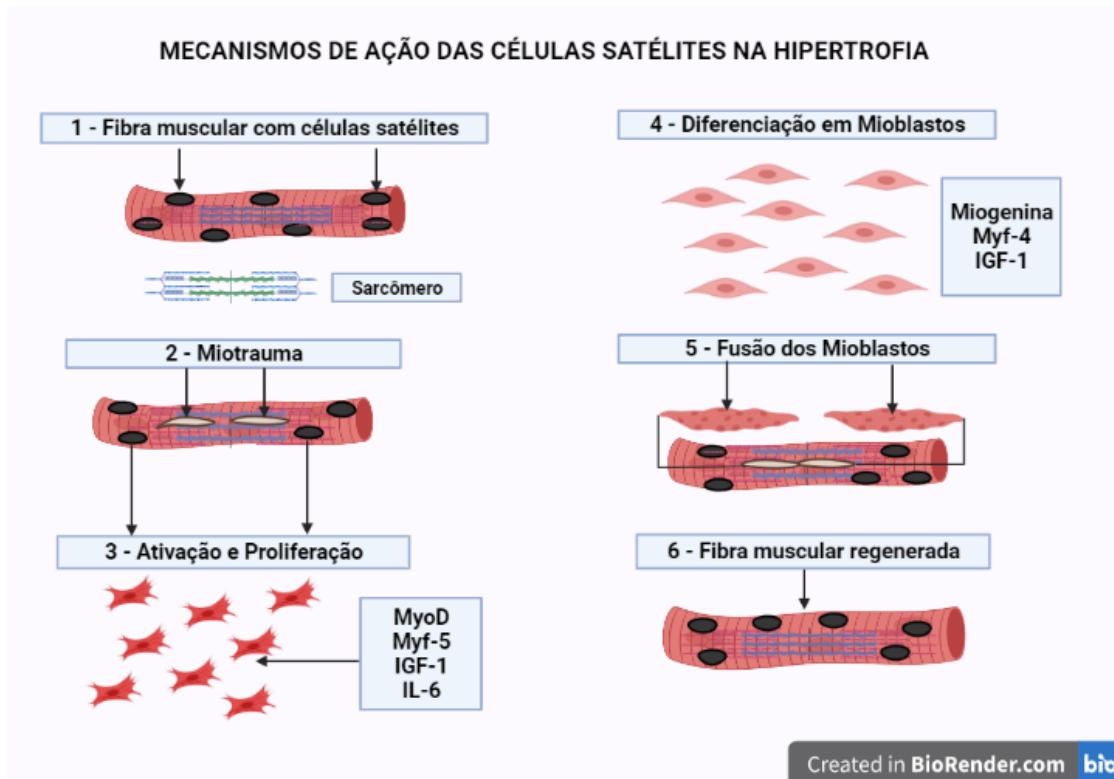


Figura 1: Esquema do processo de adaptação muscular após um miotrauma.
Fonte: Extraída de Martinelli A (2022) desenvolvida em (<https://biorender.com/>)

(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.

A hipertrofia compensatória HC do músculo esquelético é uma adaptação que ocorre devido à sobrecarga mecânica imposta ao músculo promovendo o aumento no tamanho da fibra muscular⁹⁻¹¹. Entre as formas para o aumento da demanda funcional para ganho de massa muscular destacam-se a remoção dos músculos sinergistas e a sobrecarga crônica por meio de exercícios de resistência de alta intensidade⁸⁻¹¹. Estudos anteriores têm demonstrado que a sobrecarga funcional é o princípio fundamental utilizado para promover a HC das fibras musculares em modelos experimentais¹⁰⁻¹⁵ e que o músculo plantar geralmente é o músculo utilizado para induzir uma sobrecarga mecânica em modelos experimentais de HC^{10-11,14-15}. Dessa forma,

a necessidade de adaptação neste músculo pode ocorrer quando uma sobrecarga mecânica é imposta devido a remoção de seus sinergistas, induzindo a síntese proteica excessiva, promovendo assim o aumento tanto da área da fibra muscular quanto de seu diâmetro, que resultará no aumento da massa muscular¹⁰⁻¹¹.

Na HC há um aumento da demanda metabólica e nessa situação a angiogênese local é extremamente importante para suprir as necessidades do músculo sobrecarregado. Além disso, devido ao excesso de carga, as fibras musculares passam a exibir uma maior área de secção transversa (AST) e diâmetro das fibras¹⁰⁻¹¹. Martinelli et al. (2022)¹¹, ao induzir a HC do músculo plantar em ratos observaram um aumento da AST e do diâmetro da fibra após 7 e 14 dias da indução da HC. Terena et al. (2015)¹⁰, também observaram um aumento da AST das fibras musculares do músculo plantar de ratos submetidos a HC por 14 dias.

Outro evento que poderá ocorrer é um aumento do peso úmido do músculo. O estudo de Martinelli et al. (2022)¹¹, utilizando também o modelo de HC do músculo plantar em ratos durante 14 dias, verificaram que o músculo sobrecarregado e tratado com fotobiomodulação manteve sua massa muscular semelhante ao volume da massa muscular do grupo controle. Terena et al. (2015)¹⁰, também encontraram um aumento do peso do músculo ao comparar o músculo sobrecarregado ao peso corporal do animal após 14 dias da indução da HC.

No contexto clínico, a HC acontece quando um músculo necessita adequar-se diante de uma sobrecarga excessiva imposta em virtude da ausência ou diminuição da funcionalidade de seus sinergistas, que pode ser decorrência de lesões nervosas parciais e desequilíbrios musculares⁹. Além disso, os acidentes automobilísticos e de outros tipos que podem causar uma ruptura de um tendão ou algum trauma muscular mais severo envolvendo os nervos periféricos podem evoluir para uma condição de HC¹⁶⁻¹⁸. Indivíduos afetados por essas alterações musculares podem progredir para um déficit funcional muscular.

O músculo esquelético é um tecido capaz de expressar diferentes citocinas em resposta a contração muscular, regeneração e processos adaptativos²⁴⁻²⁵. Citocinas são proteínas de baixo peso molecular que iniciam

sua ação através da ligação a receptores específicos, ativando alterações da síntese do RNA e de proteínas do organismo. Possuem capacidade de atuar de forma local, em células próximas ou podem ser secretadas pela corrente sanguínea promovendo efeitos à distância³⁰. Assim, as citocinas são importantes mediadores de vários aspectos da saúde e da doença, incluindo metabolismo de glicose e lipídios e a hipertrofia e atrofia do músculo esquelético²⁵.

As citocinas interleucina seis IL-6, interleucina um beta IL1-β e o fator de necrose tumoral alfa TNF-α, são classificadas como citocinas inflamatórias^{9, 26-28} e especificamente a IL-6, quando liberada no músculo esquelético é capaz regular positivamente a massa muscular frente a situações que requerem contrações musculares repetidas, como durante a prática de exercícios resistidos ou em situações de sobrecarga muscular excessiva. Nessas condições, há uma sinalização autócrina e parácrina dessa citocina que induzirá a hipertrofia muscular através do controle, diferenciação e proliferação de miócitos^{9,29}.

A IL-6 é a primeira citocina liberada pelo músculo esquelético, em resposta à contração muscular³⁰. Essa citocina é capaz de ativar as CS, contribuindo com o aumentando de sua proliferação, bem como formando novas fibras, auxiliando assim no aumento da massa muscular que resultará na hipertrofia do músculo a partir da sinalização das células satélites³¹.

Por outro lado, outras citocinas podem interferir negativamente na manutenção e crescimento da massa muscular, a exemplo desse mecanismo destacam-se o TNF-α e a IL1- β. O TNF-α atua no músculo esquelético como uma citocina relevante frente a redução da resposta hipertrófica do músculo e consequente comprometimento da força muscular, bem como, sobre a diminuição da capacidade de resposta ao exercício físico^{9, 32-33}.

Já a IL1- β está associada com a regulação de diversas citocinas inflamatórias incluindo a IL-6 e o TNF-α²⁷. Além disso a IL1- β pode associar-se e aos quadros de caquexia uma vez que esta citocina pode aumentar a expressão de genes catabólicos²⁷. Nesse sentido, o estudo de Braun et al. 2008³⁴, demonstraram que a IL1- β foi capaz de induzir a perda de massa muscular em camundongos.

Um outro estudo relatou que níveis séricos circulantes aumentados de IL1- β está associada a inflamação muscular próprias da distrofia muscular de Duchenne²⁸.

Reconhecendo a atuação dessas citocinas no músculo esquelético, é de grande relevância compreender os mecanismos de modulação dessas miocinas sobre um músculo exposto a condições que promovam algum tipo de dano tecidual com necessidade de reparo, como pode ocorrer na HC devido à sobrecarga aguda imposta sobre o músculo, que poderá induzi-lo a algum tipo de dano tecidual.

Outro aspecto importante em se tratando de reabilitação de pacientes é conhecer os recursos ou as formas de intervenção que possam contribuir com esse processo adaptativo frente uma sobrecarga funcional com o objetivo de tornar os músculos comprometidos mais funcionais, é o primeiro objetivo dos profissionais que trabalham na área da reabilitação. Assim, os exercícios físicos podem ser práticas importantes para a recuperação de indivíduos com esse tipo de comprometimento muscular¹⁹.

Neste contexto surgem os exercícios realizados em meio aquático. Os efeitos biológicos da imersão em água, que estão relacionados com os princípios fundamentais da hidrodinâmica, podem ser benéficos em determinados contextos de treino físico. Compreender esses efeitos e as propriedades físicas da água, como densidade, pressão hidrostática e flutuabilidade/empuxo, pode, portanto, não apenas ser benéfico nos programas de condicionamento físico, mas também em protocolos para recuperação pós-exercício e/ou reabilitação funcional²¹.

Os exercícios realizados no ambiente aquático quando comparado ao exercício realizado no solo, podem otimizar o aumento do processo de adaptação dos ajustes corporais que desempenham habilidades motoras variadas, aprimorando assim a qualidade do comportamento motor²².

Alguns dos efeitos terapêuticos obtidos em um programa de exercício aquático são: redução de edema, diminuição do espasmo muscular, melhora na amplitude de movimento, reeducação da marcha, independência funcional, melhora da coordenação motora global, diminuição do impacto e da descarga de peso sobre as articulações dentre outros²³.

O estudo de Dimitrijevic et al. (2012)²² relataram que os exercícios realizados na água são facilitados devido a ação da gravidade ser menor. Em adição, Torres et al. (2014)²¹, afirmaram que o treinamento aquático também pode produzir benefício frente a reabilitação, otimizando a prevenção de danos musculares e dores após o exercício²¹.

Já Igarashi & Noagami et al. (2018)²⁴ descreveram que os exercícios aquáticos melhoraram a dor e otimizaram a flexibilidade e a força muscular.

Com relação a síntese de citocinas, Gaia Giuriato et al. (2022)²⁵, demonstraram que o exercício físico aumenta as concentrações circulantes de citocinas inflamatórias específicas como a IL-6 e IL-1 β .

Ainda com relação a reabilitação do musculoesquelética, é importante destacar os efeitos positivos da utilização de recursos fototerápicos que tem demonstrado na literatura efeitos positivos tanto para regeneração quanto para processos adaptativos do tecido muscular, incluindo a HC. Neste sentido, a fotobiomodulação FBM com laser de baixa intensidade LBI já demonstrou diversos efeitos positivos em alterações musculoesqueléticas distintas, conforme já descrito na literatura^{9-10, 35-38}.

Os efeitos da FBM ocorrem através da absorção da luz pelos fotorreceptores presentes nas células. Os fotorreceptores modulam as reações bioquímicas e fotoquímicas nas células, promovendo a transferência de elétrons da cadeia respiratória, induzindo a síntese de adenosina trifosfato ATP, esse processo é denominado como cadeia mitocondrial respiratória³⁹.

Dentre os efeitos positivos da FBML aplicada de forma local no tecido muscular, encontram-se a modulação da resposta inflamatória, a síntese e produção de colágeno⁴⁰⁻⁴¹ e o remodelamento da matriz extracelular MEC⁴², além de apresentar efeitos positivos sobre os fatores regulatórios miogênicos⁴³ e sobre a angiogênese após lesão muscular aguda⁴². Mesquita-Ferrari et al. (2011)³⁸ ao utilizarem o FBM após lesão aguda em tecido muscular, verificaram uma diminuição na expressão da citocina TNF- α após 1 e 7 dias, no grupo lesão com FBM em comparação ao grupo lesão sem FBM. Além disso, houve diminuição da citocina TGF- β aos 7 dias no grupo que recebeu a FBM em comparação ao grupo lesão sem FBM e após 14 dias houve uma diminuição significativa de TGF- β no grupo lesão com FBM em comparação ao grupo controle. Em um modelo de HC, Terena et al. (2015)¹⁰, analisaram o efeito da

FBM λ 780nm, 1W/cm², 3,2 J, 80 seg, sobre os aspectos morfológicos do tecido muscular durante o processo de HC por sobrecarga em ratos Wistar e encontraram um aumento na área de secção transversa AST das fibras musculares após 14 dias. Em um outro estudo, Terena et al. (2018)³⁵, utilizando a FBM nos parâmetros: λ 780nm, 1W/cm², 3,2 J, 80 seg, aplicada em 8 pontos ao redor do músculo plantar, demonstraram que durante a HC do músculo plantar em ratos induzida por ablação de seus sinergistas (gastrocnêmio e sóleo), houve no grupo irradiado um aumento na quantidade de mionúcleos após 14 dias, aumento do colágeno no grupo irradiado após 7 dias seguido de uma diminuição após 14 dias. Observou-se ainda melhor organização das fibras colágenas nos tendões após 14 dias de irradiação ao compará-las com as fibras do grupo que não recebeu irradiação com FBM.

Martinelli et al. (2020)⁹ observaram que a FBM infravermelha λ 780nm, 1W/cm², 3,2 J, 80 seg, aplicada de forma local sobre o músculo plantar, modulou positivamente citocinas inflamatórias chaves participantes no processo de aumento e diminuição da massa muscular após 7 e 14 dias de indução da sobrecarga muscular. E Martinelli et al. (2022)¹¹, utilizando a FBML aplicada de forma local sobre o músculo plantar ou aplicada de forma vascular sistêmica FBMV sobre um vaso sanguíneo localizado na cauda de ratos Wistar, verificaram que a forma sistêmica aumentou a AST após sete e 14 dias. Além disso, após sete dias, observou-se um aumento no diâmetro da fibra muscular nos animais irradiados com FBMV e aos 14 dias observou-se um aumento no diâmetro da fibra em ambos os grupos irradiados, FBM e FBMV.

Justificativa

A compreensão de como a FBM associada ao protocolo de treinamento aquático podem interferir sobre aspectos relevantes a um músculo exposto a uma sobrecarga funcional, bem como, avaliar os efeitos distintos apenas do exercício de resistência ou do exercício associado a FBM frente a hipertrofia compensatória, nos permite ampliar o entendimento de ação dessas duas formas de intervenção terapêuticas muito utilizadas na reabilitação, a FBM e exercícios de resistência em meio aquático, possibilitando determinar qual protocolo de tratamento pode resultar na melhor resposta funcional do músculo plantar quando submetido a hipertrofia compensatória.

Não há relatos dos efeitos da FBM quando aplicada de forma local (FBML) associada a prática de exercícios de resistência em meio aquático sobre as citocinas inflamatórias durante o processo de hipertrofia compensatória.

Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa ^{9, 10, 35}, demonstraram efeitos positivos da FBM durante o processo de HC, contudo não foi aliada a associação da FBM com a prática de exercício que é constante em protocolos de reabilitação utilizados clinicamente para a hipertrofia muscular. Assim de forma inédita no presente estudo, associamos o uso da FBM, que já demonstrou ser uma terapia promissora frente ao processo de HC, à prática de treinamento aquático, o que nos permite investigar se tal associação pode promover alterações moleculares e morfológicas positivas em um músculo exposto à uma sobrecarga excessiva como ocorre na HC.

Como hipótese o exercício de resistência em meio aquático associado ao protocolo de FBM, poderá interferir de forma positiva sobre os aspectos moleculares importantes ao músculo esquelético. O exercício em meio aquático associado ao protocolo de FBM, também poderá influenciar nos aspectos morfológicos do músculo plantar de ratos promovendo assim uma resposta positiva no que diz respeito aos mecanismos que interferem diretamente na hipertrofia compensatória do músculo plantar de forma a contribuir com o aumento da massa muscular.

2. OBJETIVOS

GERAL: Avaliar os efeitos do treinamento aquático e sua associação com FBM sobre a síntese de citocinas e aspectos morfológicos do músculo plantar durante processo de HC em ratos Wistar.

ESPECÍFICOS: Avaliar os efeitos da FBM com laser em baixa intensidade associado protocolo treinamento aquático durante HC do músculo plantar de ratos Wistar no que se refere a:

- A massa muscular dos músculos plantares direitos e esquerdos;
- Expressão proteica da citocina inflamatória TNF- α ;
- Aspectos morfológicos do músculo plantar incluindo:
 - ✓ Área de secção transversa;
 - ✓ Diâmetro das fibras

3. METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (protocolo CEUA nº 1664030522) 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 26 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, Mammalia), com aproximadamente 8 semanas de vida e peso médio de 280g mantidos no biotério da (UNINOVE).

Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, em ambiente climatizado com temperatura controlada (22 a 25°C), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro) e com comida (NUTRILAB CR-1®) e água *ad libitum*.

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

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

3.2 Grupos Experimentais

- **Grupo Controle Hipertrofia (HC):** Os animais foram somente submetidos à ablação bilateral dos músculos sinergistas do músculo plantar (sem treinamento aquático TA e sem FBM). Foram eutanasiados após 7 (n=3) e 14 dias (n=3) do início do experimento (n=6); (6 animais, 12 amostras/patas);
- **Grupo Hipertrofia + Treinamento Aquático (HC+TA):** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar bilateralmente e foram somente submetidos ao TA. Os animais foram eutanasiados após 7 (n=5) e 14 (n=5) dias do início do experimento (n=20) (10 animais e 20 amostras);
- **Grupo Hipertrofia + Treinamento Aquático + FBM (HC+TA+FBM):** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar bilateralmente, ao TA. Nesse grupo os animais foram

submetidos também ao protocolo FBM local na região da posterior da pata esquerda. Os animais foram eutanasiados após 7 (n=5) e 14 (n=5) dias do início do experimento (n=20) (10 animais e 20 amostras).

Destacamos que no presente estudo não foi incluído o grupo hipertrofia compensatória + FBM, com o intuito de diminuir o número de animais utilizados no estudo conforme preconiza o CEUA, visto que este grupo já foi investigado em estudos anteriores em modelo de HC, que avaliaram o efeito da FBM local sobre os aspectos moleculares e morfológicos dos músculos plantares de ratos durante o processo de HC.

3.3 Fluxograma do estudo

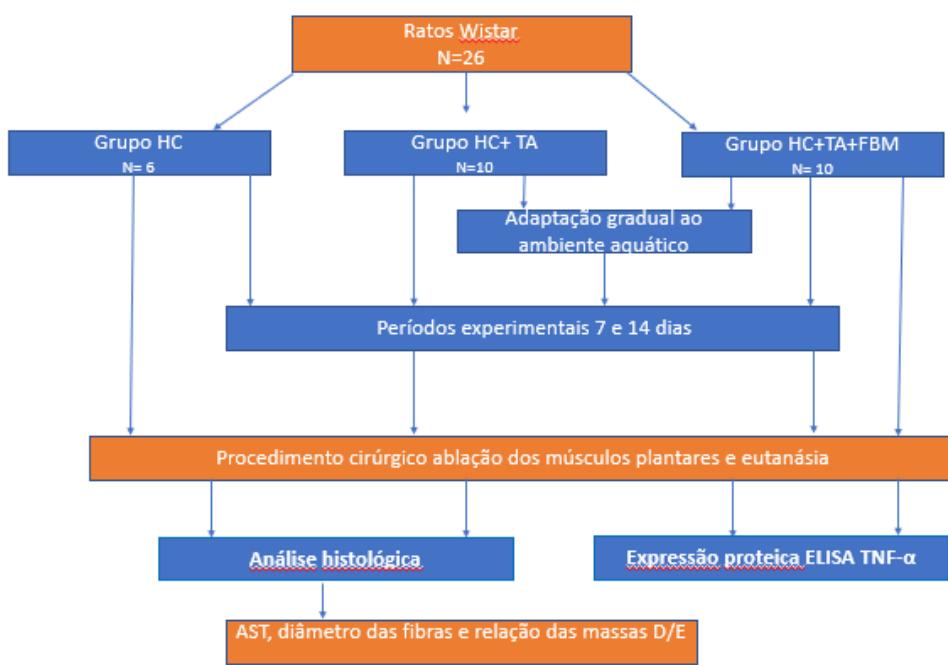


Figura 2: Fluxograma da metodologia de estudo incluindo os diferentes grupos, períodos experimentais e análises realizadas.

3.4 Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado conforme descrito previamente na literatura^{4,9, 12}. O modelo de HC utilizado no presente estudo, consiste na remoção cirúrgica dos músculos sinergistas gastrocnêmio e sóleos do músculo plantar, bilateralmente, impondo uma sobrecarga de trabalho funcional sobre esse músculo^{4,9-10}. Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal a base de Ketamina 10% (0,2 mL/100g do peso do animal) (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e Xilazina 2% (0,1 mL/100g do peso do animal) (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas de modelo insulina. Em seguida foi realizada a tricotomia seguida da incisão longitudinal na região dorsal das patas 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. O músculo plantar situado abaixo dos músculos removidos foi preservado e sofrerá a sobrecarga funcional.

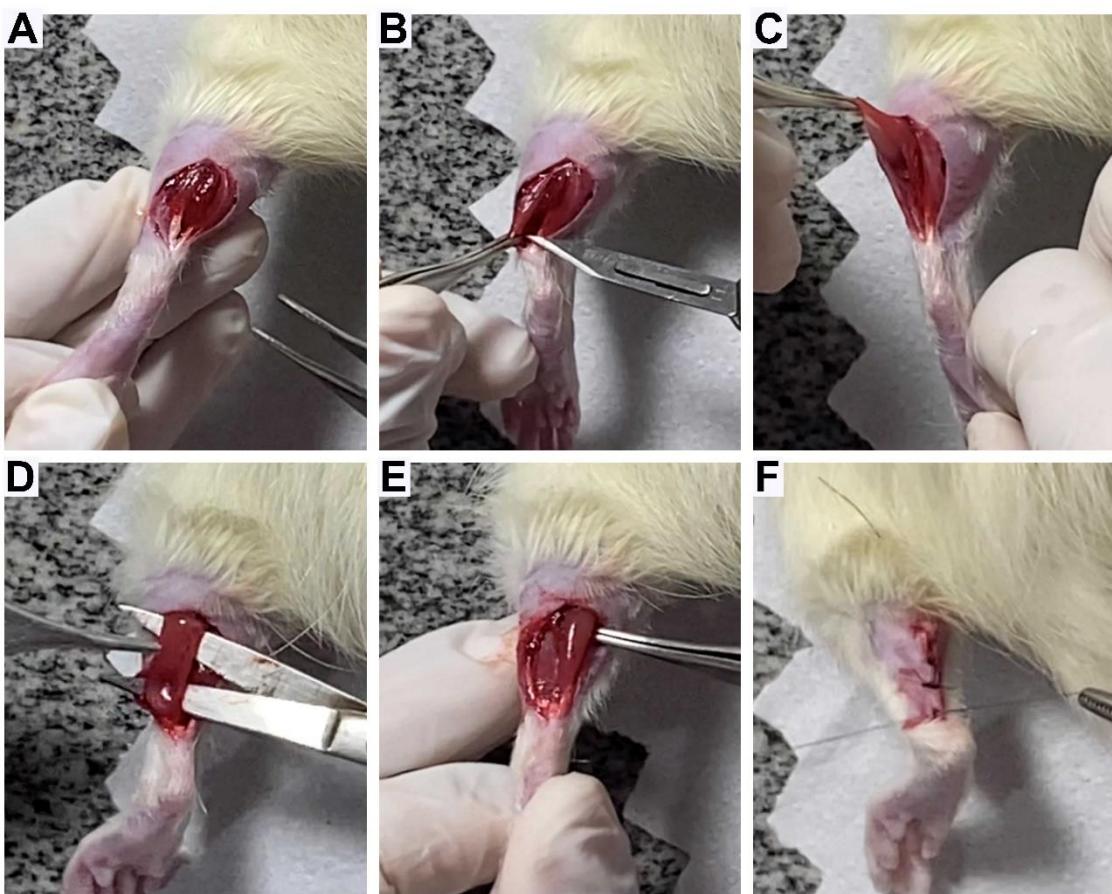


Figura 3: Procedimento cirúrgico de ablação dos sinergistas para a hipertrofia do músculo plantar. (A) incisão longitudinal da região posterior da pata traseira; (B) exposição, secção do tendão e(C) retirada parcial do m. gastrocnêmio lateral (D) retirada parcial do ventre muscular do m. gastrocnêmio medial; (E) ablação do músculo sóleo; (F) sutura na área da incisão. **Fonte:** próprio autor

Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida Ethicon® e os animais foram mantidos em gaiolas.

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

Com o objetivo de diminuir a sensibilidade dolorosa 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.

3.5 Protocolo de Treinamento Aquático (TA)

O protocolo de TA foi realizado de acordo com o descrito por Beasi et al (2021)⁴⁴. Dessa forma, foram utilizados tanques de cloreto de polivinila PVC 35cm x 30cm x 30cm com alça metálica e galvanizada, graduados em silk-screen marcando de (1L a 18L) e sendo preenchido com água até 20L de água 31+/-1° aquecida com aquecedor portátil de água (ebulidor) e controlada com termômetro digital e com uma profundidade de 20 cm. Durante a realização do protocolo de TA não foi imposta carga sobre o corpo do animal. Na semana anterior ao procedimento cirúrgico da HC, os animais foram submetidos a adaptação ao ambiente aquático e ao treinamento adaptativo da prática de exercício com aumento gradativo do tempo de treinamento. As sessões de adaptação foram de 15 min no primeiro dia, 30 min no segundo dia, 45 min no terceiro dia e a partir do quarto dia todas as sessões tiveram duração de 60 min.

O treinamento efetivo ocorreu nos dias 3 a 7 após a indução da HC nos grupos avaliados em 7 dias n=5 sessões de TA e nos dias 3 a 7 e 10 a 14 nos grupos avaliados em 14 dias n=10 sessões de TA, sempre no mesmo horário e a cada 24h. Os animais do grupo HC + TA e grupo HC+ TA + FBM, realizaram o treinamento por 5 ou 10 sessões de 60 min cada, de acordo com o período experimental de cada grupo que foi de 7 ou 14 dias. Durante o período de realização do TA, um pesquisador permaneceu observando o movimento dos animais durante todo o treinamento, para se certificar que não houve períodos de inatividade no tanque. Ao término das sessões do protocolo de TA os animais foram secos e aquecidos e retornaram as gaiolas. O dia da cirurgia foi considerado o dia zero e nesse dia não houve treinamento. Nos dias 1 e 2 os animais avaliados em 7 e 14 dias, não foram submetidos ao protocolo de TA afim de preservar o local da cirurgia. Nos dias 3 a 7 os animais realizaram o protocolo de TA, totalizando 5 dias de TA. No sétimo dia foi o término do protocolo experimental dos animais dos grupos avaliados em 7 dias.

Assim, após a última sessão de TA dos grupos avaliados por 7 dias, os animais foram eutanasiados. Na sequência, os animais dos grupos avaliados em 14 dias não realizaram treinamento nos dias 8 e 9. Nos dias 10 a 14, os animais realizaram o TA totalizando 10 dias de treinamento. No décimo quarto

dia após a última sessão de treinamento, os animais foram eutanasiados.

3.6 Imagens do Protocolo do Treinamento Aquático (TA)

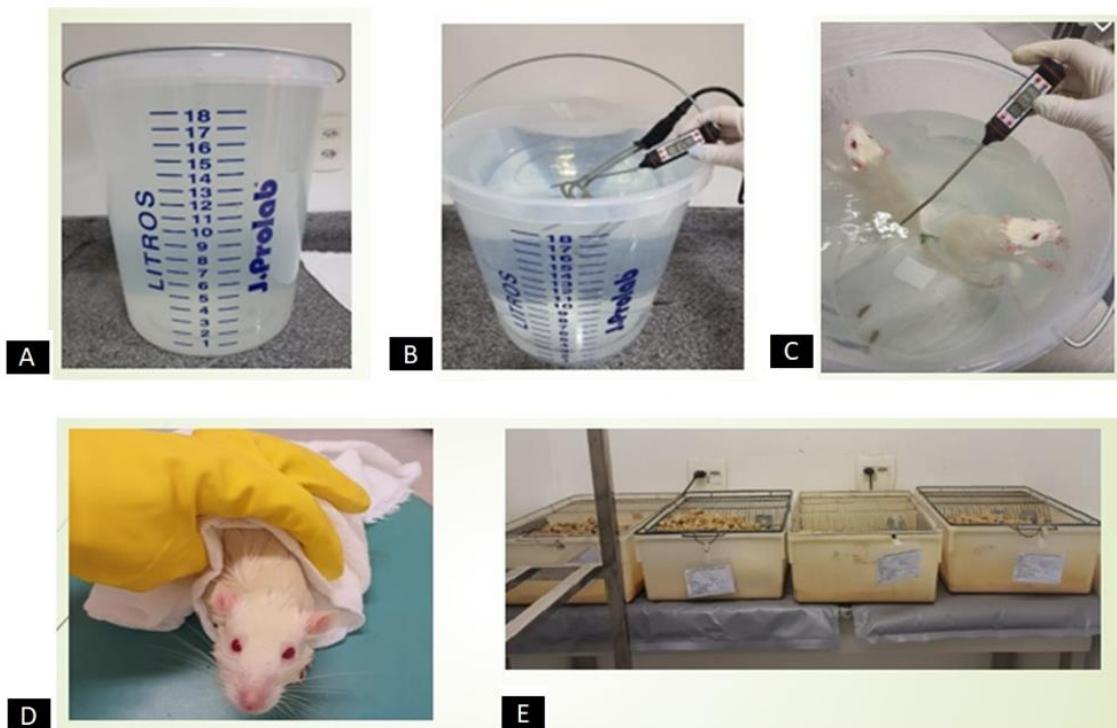


Figura 4: (A) Dispositivo de TA preenchido com água; (B) Uso do ebulidor e termômetro; (C) Animais realizando o protocolo de TA e a demonstração da aferição de temperatura da água; (D) Secagem manual e individual dos animais; (E) Acomodação dos animais em suas gaiolas sobre manta térmica. **Fonte:** próprio autor.

3.7 Protocolo de Fotobiomodulação

Os animais do grupo HC + TA + FBM foram irradiados diariamente com LBI após a realização do protocolo de TA com os parâmetros baseados em estudos prévios^{9, 11, 35} tabela 1 utilizando o equipamento de LBI TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil. A irradiação foi unilateral (pata esquerda), diariamente até o término do período experimental 7 ou 14 dias. Para evitar refração do feixe do laser aplicação será realizada no ângulo de 90°C entre o emissor e a pele do animal (aplicação perpendicular). No início e final do

procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser será aferida utilizando o Laser Checkpower meter (MM Optics, São Carlos SP, Brasil).

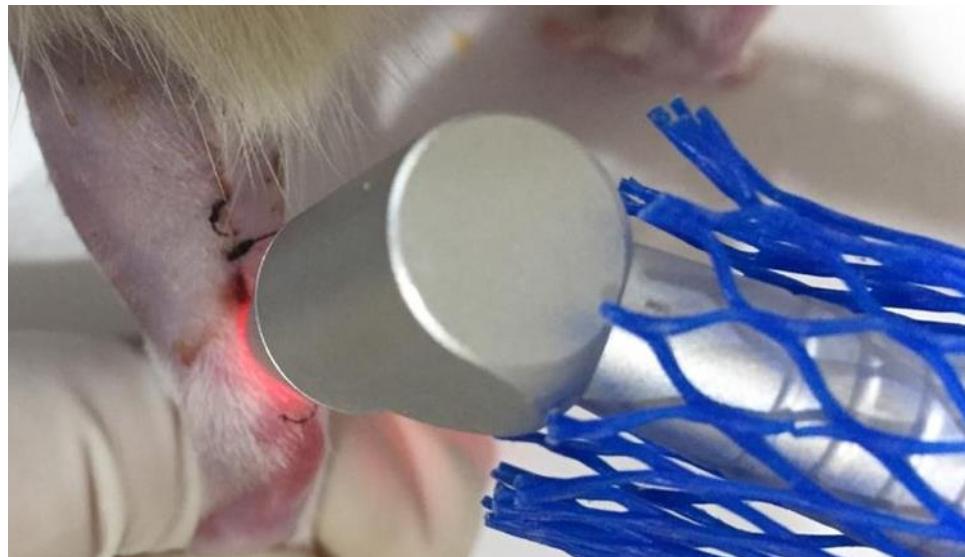


Figura 5: Procedimento de irradiação com LBI aplicado ao redor da sutura na região da pele que recobre o músculo plantar. **Fonte:** próprio autor

Tabela 1: Parâmetros dosimétricos utilizados na irradiação

| Meio ativo | Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) |
|------------------------------|----------------------------------------------|
| Comprimento de onda | 780 nm |
| Área do feixe | 0,04 cm ² |
| Potência média | 40 mW |
| Densidade de potência | 1 W/cm ² |
| Exposição radiante | 10 J/cm ² |
| Energia por ponto | 0.4 J |
| Total de pontos | 8 pontos |
| Tempo por ponto | 10 segundos |
| Tempo total | 80 segundos |
| Energia total | 3.2 J |

3.8 Procedimento de eutanásia e coleta do material

Após o período experimental de cada grupo 7 e 14 dias, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (2x a dose aplicada para a anestesia), foi realizada assepsia, tricotomia, incisão para exposição total e remoção dos músculos plantares. Os músculos plantares foram coletados e imediatamente pesados para análise da relação da massa muscular em comparação ao peso corpóreo do animal. Os músculos também foram utilizados para a análises da expressão proteica de TNF- α por ELISA, utilizando kits comerciais (R&D System, Minneapolis, EUA) e para análise histológica por técnica de HE.

3.9 Análise da massa muscular

Após a eutanásia dos animais nos diferentes períodos de análise, os músculos plantares direito e esquerdo foram cuidadosamente removidos por meio da ressecção do tendão de origem e da inserção óssea e limpos conforme descrito anteriormente. Os músculos foram pesados em uma balança semi-analítica e para cada animal foi calculada a relação de massa muscular em comparação ao peso corpóreo do animal como descrito anteriormente por Terena et al. (2015)¹⁰.

usando a seguinte fórmula:

$$r = \frac{m}{PC}$$

Sendo:

r: relação de massa muscular

m: massa muscular

PC: peso corporal

Para essa análise foram coletados os dados de 3 animais no grupo HC e 5 animais dos grupos HC + TA e grupo HC + TA + FBM.

3.10 Análise de expressão proteica: ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Amostras dos músculos plantares também foram submetidas a análise de expressão proteica das citocinas TNF- α . Para isso, os músculos foram pesados e homogeneizados (Fisher Scientific® PowerGen 125) com tampão de extração RIPA e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0.1 mM. Em seguida, o extrato tecidual foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a -80°C até o momento da análise. A quantificação de proteína total nas amostras foi realizada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), com comprimento de onda de (260 e 280) nm. Os níveis de TNF- α no extrato do músculo plantar dos animais foram avaliadas através do ensaio imunoenzimático ELISA, seguindo recomendações dos kits comerciais (R&D System, Minneapolis, EUA). Para essa análise foram coletados os dados de 3 animais do grupo HC e 5 animais dos grupos HC + TA e grupo HC + FBM.

3.11 Análise histológica do tecido muscular

As amostras musculares foram também utilizadas para análise morfológica e para este procedimento 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, passados três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xitol (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 10 μ m 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) para serem avaliados os seguintes aspectos morfológicos: diâmetro das fibras musculares e área de secção transversa (AST).

Para permitir a análise quantitativa destes aspectos foram consideradas 3 áreas por lâmina de 3 animais/grupo. 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 de Resultados

Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e foram expressos em média e desvio-padrão se aderirem à curva de Gauss ou mediana e intervalo interquartílico se não aderirem. A comparação entre os grupos foi realizada pela ANOVA se os dados forem paramétricos ou pelo Kruskal-Wallis se não paramétricos. O Teste de contraste (Pós-Hoc) utilizado será 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

A associação da fotobiomodulação e do treinamento aquático reduzem a expressão de TNF- α e aumentam a área da fibra muscular durante o processo de HC em ratos Wistar

Valéria-Araújo Gregio¹, Martinelli A¹, Andreo L², Santos TC², Terena SML²
Bussadori SK^{1,2}, Fernandes KPS², Mesquita-Ferrari RA^{1,2}

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: 88887.613008/2021-00 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (www.fapesp.br); número do processo: 2020/13976-0)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
310491/2021-5

RESUMO

A hipertrofia compensatória (HC) ocorre devido à sobrecarga mecânica imposta ao músculo promovendo o aumento no tamanho de suas fibras. A fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado resultados positivos em modular citocinas envolvidas na adaptação muscular necessária durante a HC promovendo o aumento da área de secção transversa e melhorando a organização do colágeno. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do treinamento aquático (TA) e sua associação com FBM na síntese de citocinas e aspectos morfológicos do músculo plantar durante processo de HC em ratos Wistar. Foram utilizados 26 ratos Wistar machos divididos em 3 grupos: (1) Controle Hipertrofia compensatória (HC) (n=6 animais; n=12 amostras - cirurgia bilateral); (2) HC+TA n=20 amostras e (3) HC+TA + FBM local (FBML) (n=20). Antes do procedimento cirúrgico os animais foram submetidos a adaptação em TA por 5 dias de forma progressiva dia 1- 15min, dia 2- 30min, dia 3- 45min, 60min nos dois dias seguintes. A HC foi induzida pela ablação bilateral dos músculos sinergistas do músculo plantar músculos gastrocnêmio lateral e medial do sóleo. A FBM foi realizada com LBI AsGaAl 780 nm, 10 J/cm², 40 mW, 10 s, 8 pontos, 3.2 J de energia total. Os animais realizaram o TA em tanques de cloreto de polivinila (PVC) 35cmx30cmx30cm com capacidade de 20L e temperatura média de 31+- 1°C com duração de 60 min/dia, 5 vezes por semana, durante os 7 e 14 dias. Após esse período, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos e os músculos plantares foram removidos e utilizados para análise do peso em relação ao peso corporal dos animais, análise de expressão proteica de TNF-α por ELISA e para análise de aspectos morfológicos incluindo o diâmetro das fibras e área de secção transversa (AST) por técnica de histologia com coloração H&E. Os dados foram submetidos a análise estatística e expressos em média e erro padrão da média sendo a comparação entre os grupos realizada pela ANOVA e pós-Hoc Tukey utilizando o programa Grap Pad Prism 5.00 (Califórnia). Os resultados de massa muscular em relação ao peso corporal dos animais demonstraram que não houve diferença entre os grupos HC, HC+TA e grupo HC + TA + FBM em nenhum dos períodos experimentais. A análise de expressão proteica por ELISA demonstrou que em 7 dias houve uma redução nos níveis de TNF-α nos grupos HC+TA+FBM quando comparado ao grupo Controle HC. Não houve diferença entre os grupos HC+ TA e grupo HC+TA +FBM. Após 14 dias não foram encontradas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. Os resultados da análise da AST das fibras musculares demonstraram maiores valores de área após 7 dias no grupo HC+ TA+FBM, quando comparado ao grupo HC+TA e menores valores de área no grupo HC+TA quando comparado ao grupo Controle HC. Após 14 dias maiores valores de área foi observado no grupo HC+TA+FBM quando comparado ao grupo HC + TA. A análise quantitativa do diâmetro das fibras, demonstrou que após 7 dias não houve diferença entre os grupos experimentais e após 14 dias houve um aumento nos grupos HC+TA e HC+TA+ FBM quando comparados ao grupo HC. Em conclusão, a associação do TA associado a FBM modulou a expressão de TNF -α e aumentou a AST e o diâmetro das fibras musculares. Além disso, a TA realizado sem a associação da FBM, também promoveu o aumento do diâmetro das fibras.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; laser em baixa intensidade; hipertrofia; músculo esquelético, exercícios aquáticos, exercícios de resistência.

ABSTRACT

Compensatory hypertrophy (CH) occurs when a mechanical overload is imposed on the muscle promoting an increase in the size of its fibers. The photobiomodulation (PBM) with low intensity laser (LLLT) showed positive results in modulating cytokines involved in muscle adaptation necessary during

CH promoting an increase in cross-sectional area and improving collagen organization. The aim of this study was to evaluate the effects of aquatic training and its association with PBM on cytokine synthesis and morphological aspects of the plantar muscle during the CH process in Wistar rats. Twenty-six male Wistar rats divided into 3 groups were used: (1) Control Compensatory Hypertrophy (CH) n=6 animals; n=12 samples because the surgery is bilateral); (2) Hypertrophy + Aquatic Training (CH+AT) n=20 samples and (3) Hypertrophy + Aquatic Training + PBM (CH+AT+PBM) (n=20). Before the surgical procedure the animals underwent adaptation in AT for 5 days progressively day 1- 15min, day 2-30min, day 3- 45min, 60min the next two days. CH was induced by bilateral ablation of the plantar muscle synergist muscles lateral gastrocnemius and medial soleus. PBM was performed with AsGaAl 780 nm, 10 J/cm², 40 mW, 10 s, 8 points, 3.2 J total energy. The animals performed the swimming exercises in PVC polyvinyl chloride tanks 35cm x 30cm x 30cm with a capacity of 20L and an average temperature of 31+- 1°C. The animals swam for 60 min/day, 5 times a week, during the 7 and 14 days. After this period, the animals were euthanized by anesthetic overdose and the plantar muscles were removed and used for weight analysis in relation to the animals' body weight, protein expression analysis of TNF -α by ELISA and pananalysis of morphological aspects including fiber diameter and cross-sectional area (CSA) by histology technique with H&E staining. Data were tested for normality by Kolmogorov-Smirnov test and expressed as mean and standard error of the mean. The comparison between groups was performed by ANOVA. The Tukey contrast (post hoc) test was used. All data were analyzed using the program G rap Pad Prism 5.00 (California) The results of the muscle mass analysis in relation to the animals' body weight showed that there was no difference between the CH, CH+AT and CH + AT + PBM groups in any of the experimental periods. The protein expression analysis by ELISA demonstrated that at 7 days there was a reduction in TNF-α levels in the CH+AT+PBM groups when compared to the CH Control group. There was no difference between the CH+AT group and the CH+AT+PBM group. After 14 days, no statistical differences were found between the different experimental groups. The results of the CSA analysis of the muscle fibers showed higher area values after 7 days in the CH+AT+PBM group, when compared to the CH+AT group CSA and smaller in area in the CH+AT group when compared to the Control CH group. After 14 days, greater area values were observed in the CH+AT+PBM group when compared to the CH + AT group. The quantitative analysis of fiber diameter showed that after 7 days there was no difference between the experimental groups and after 14 days there was an increase in the CH+AT and CH+AT+PBM groups when compared to the CH group. In conclusion, TA associated with PBM modulated the expression of TNF -α and increased CSA and muscle fiber diameter. In addition, AT performed without the association of PBM, also promoted the increase in fiber diameter.

Keywords: Photobiomodulation; low intensity laser; hypertrophy; skeletal muscle; aquatic exercises; resistance exercises.

Introdução

O músculo esquelético é um tecido com grande plasticidade caracterizada pela habilidade de se adaptar a estímulos ambientais externos.¹⁻². O tecido muscular esquelético é composto por células musculares advindas

da diferenciação de células precursoras em miócitos e que se fundiram formando as fibras musculares multinucleadas responsáveis por produzirem força e movimento durante o processo de contração muscular³.

Considerando o aspecto funcional, as fibras musculares podem ser classificadas como rápidas ou fibras do tipo II (IIa, IIb, IIx/IId) e as lentas que são representadas pelas fibras do tipo I.

As CS, são células tronco mononucleares, fusiformes, localizadas paralelamente nas fibras musculares do músculo esquelético entre o sarcolema e a lámina basal. Na literatura, desde sua descoberta há mais de cinco décadas aproximadamente, estuda-se qual a sua contribuição para a manutenção da massa muscular, regeneração e hipertrofia do músculo esquelético⁶. No que diz respeito a hipertrofia, as CS são responsáveis por contribuir diretamente com o aumento da massa muscular. Dessa forma, frente a um estímulo de sobrecarga por exercício ou após um dano muscular, essas células são ativadas e iniciam os eventos de proliferação, diferenciação, migração e fusão com a fibra adulta ou formação de uma nova fibra muscular^{1, 6-7}. Assim o processo de hipertrofia da fibra muscular esquelética decorre do aumento da concentração das células satélites CS nas fibras⁵.

A hipertrofia do músculo esquelético pode envolver os seguintes mecanismos: (1) ativação das CS em respostas a um estímulo agudo, como no caso da ablação sinérgica de determinados músculos ou (2) a realização de exercícios excêntrico de alto impacto⁸. É importante destacar que estas são situações relacionados a ocorrência de micro lesões próprias do processo adaptativo da fibra muscular^{6,7}.

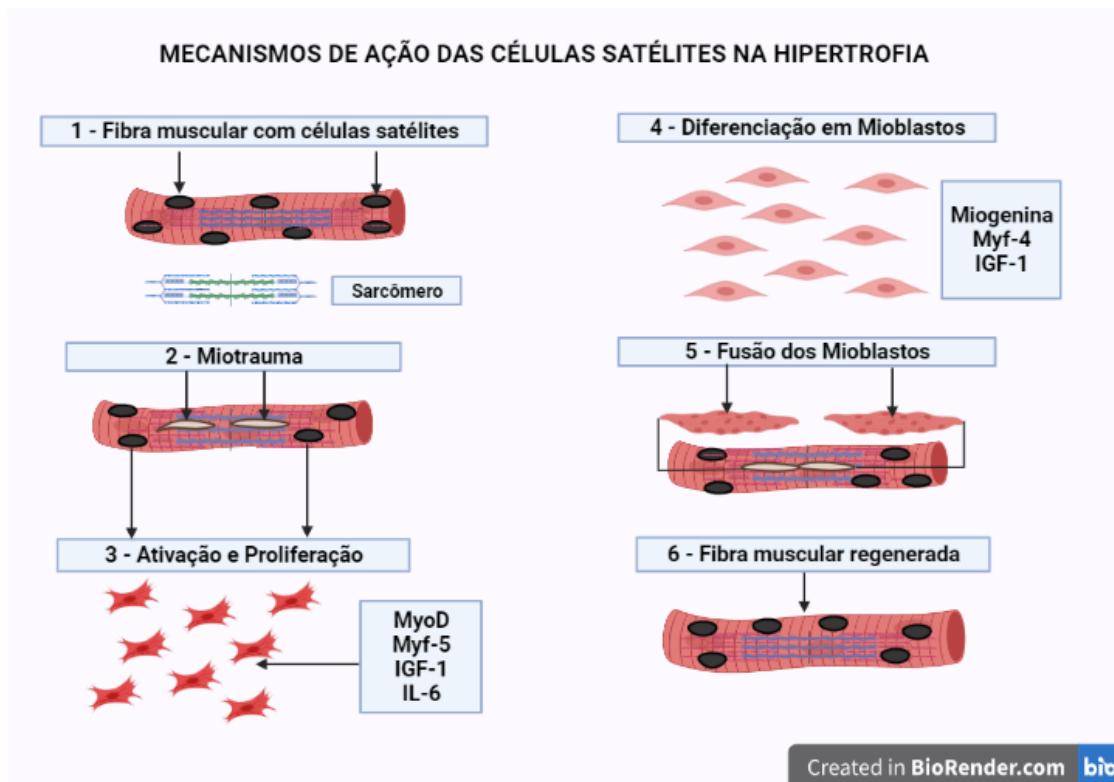


Figura 1: Esquema do processo de adaptação muscular após um miotrauma.

Fonte: Extraída de Martinelli A (2022)⁽¹¹⁾ desenvolvida em (<https://biorender.com/>)

(2). 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.

A hipertrofia compensatória HC do músculo esquelético é uma adaptação que ocorre devido à sobrecarga mecânica imposta ao músculo promovendo o aumento no tamanho da fibra muscular⁹⁻¹¹. Entre as formas para o aumento da demanda funcional para ganho de massa muscular destacam-se a remoção dos músculos sinergistas e a sobrecarga crônica por meio de exercícios de resistência de alta intensidade⁸⁻¹¹. Estudos anteriores têm demonstrado que a sobrecarga funcional é o princípio fundamental utilizado para promover a HC das fibras musculares em modelos experimentais¹⁰⁻¹⁵ e que o músculo plantar geralmente é o músculo utilizado para induzir uma sobrecarga mecânica em modelos experimentais de HC^{10-11,14-15}. Dessa forma, a necessidade de adaptação neste músculo pode ocorrer quando uma sobrecarga mecânica é

imposta devido a remoção de seus sinergistas, induzindo a síntese proteica excessiva, promovendo assim o aumento tanto da área da fibra muscular quanto de seu diâmetro, que resultará no aumento da massa muscular¹⁰⁻¹¹.

Na HC há um aumento da demanda metabólica e nessa situação a angiogênese local é extremamente importante para suprir as necessidades do músculo sobrecarregado. Além disso, devido ao excesso de carga, as fibras musculares passam a exibir uma maior área de secção transversa AST e diâmetro das fibras¹⁰⁻¹¹. Martinelli et al. (2022)¹¹, ao induzir a HC do músculo plantar em ratos observaram um aumento da AST e do diâmetro da fibra após 7 e 14 dias da indução da HC. Terena et al. (2015)¹⁰, também observaram um aumento da AST das fibras musculares do músculo plantar de ratos submetidos a HC por 14 dias.

Outro evento que poderá ocorrer é um aumento do peso úmido do músculo. O estudo de Martinelli et al. (2022)¹¹, utilizando também o modelo de HC do músculo plantar em ratos durante 14 dias, verificaram que o músculo sobrecarregado e tratado com fotobiomodulação manteve sua massa muscular semelhante ao volume da massa muscular do grupo controle. Terena et al. (2015)¹⁰, também encontraram um aumento do peso do músculo ao comparar o músculo sobrecarregado ao peso corporal do animal após 14 dias da indução da HC.

No contexto clínico, a HC acontece quando um músculo necessita adequar-se diante de uma sobrecarga excessiva imposta em virtude da ausência ou diminuição da funcionalidade de seus sinergistas, que pode ser decorrência de lesões nervosas parciais e desequilíbrios musculares⁹. Além disso, os acidentes automobilísticos e de outros tipos que podem causar uma ruptura de um tendão ou algum trauma muscular mais severo envolvendo os nervos periféricos podem evoluir para uma condição de HC¹⁶⁻¹⁸. Indivíduos afetados por essas alterações musculares podem progredir para um déficit funcional muscular.

O músculo esquelético é um tecido capaz de expressar diferentes citocinas em resposta a contração muscular, regeneração e processos adaptativos²⁴⁻²⁵. Citocinas são proteínas de baixo peso molecular que iniciam sua ação através da ligação a receptores específicos, ativando alterações da

síntese do RNA e de proteínas do organismo. Possuem capacidade de atuar de forma local, em células próximas ou podem ser secretadas pela corrente sanguínea promovendo efeitos à distância³⁰. Assim, as citocinas são importantes mediadores de vários aspectos da saúde e da doença, incluindo metabolismo de glicose e lipídios e a hipertrofia e atrofia do músculo esquelético²⁵.

As citocinas interleucina seis IL-6, interleucina um beta IL1-β e o fator de necrose tumoral alfa TNF-α, são classificadas como citocinas inflamatórias^{9, 26-28} e especificamente a IL-6, quando liberada no músculo esquelético é capaz regular positivamente a massa muscular frente a situações que requerem contrações musculares repetidas, como durante a prática de exercícios resistidos ou em situações de sobrecarga muscular excessiva. Nessas condições, há uma sinalização autócrina e parácrina dessa citocina que induzirá a hipertrofia muscular através do controle, diferenciação e proliferação de miócitos^{9,29}.

A IL-6 é a primeira citocina liberada pelo músculo esquelético, em resposta à contração muscular³⁰. Essa citocina é capaz de ativar as CS, contribuindo com o aumentando de sua proliferação, bem como formando novas fibras, auxiliando assim no aumento da massa muscular que resultará na hipertrofia do músculo a partir da sinalização das células satélites³¹.

Por outro lado, outras citocinas podem interferir negativamente na manutenção e crescimento da massa muscular, a exemplo desse mecanismo destacam-se o TNF-α e a IL1- β. O TNF-α atua no músculo esquelético como uma citocina relevante frente a redução da resposta hipertrófica do músculo e consequente comprometimento da força muscular, bem como, sobre a diminuição da capacidade de resposta ao exercício físico^{9, 32-33}.

Já a IL1- β está associada com a regulação de diversas citocinas inflamatórias incluindo a IL-6 e o TNF-α²⁷. Além disso a IL1- β pode associar-se e aos quadros de caquexia uma vez que esta citocina pode aumentar a expressão de genes catabólicos²⁷. Nesse sentido, o estudo de Braun et al. 2008³⁴, demonstraram que a IL1- β foi capaz de induzir a perda de massa muscular em camundongos.

Um outro estudo relatou que níveis séricos circulantes aumentados de IL1- β está associada a inflamação muscular próprias da distrofia muscular de Duchenne²⁸.

Reconhecendo a atuação dessas citocinas no músculo esquelético, é de grande relevância compreender os mecanismos de modulação dessas miocinas sobre um músculo exposto a condições que promovam algum tipo de dano tecidual com necessidade de reparo, como pode ocorrer na HC devido à sobrecarga aguda imposta sobre o músculo, que poderá induzi-lo a algum tipo de dano tecidual.

Outro aspecto importante em se tratando de reabilitação de pacientes é conhecer os recursos ou as formas de intervenção que possam contribuir com esse processo adaptativo frente uma sobrecarga funcional com o objetivo de tornar os músculos comprometidos mais funcionais, é o primeiro objetivo dos profissionais que trabalham na área da reabilitação. Assim, os exercícios físicos podem ser práticas importantes para a recuperação de indivíduos com esse tipo de comprometimento muscular¹⁹.

Neste contexto surgem os exercícios realizados em meio aquático. Os efeitos biológicos da imersão em água, que estão relacionados com os princípios fundamentais da hidrodinâmica, podem ser benéficos em determinados contextos de treino físico. Compreender esses efeitos e as propriedades físicas da água, como densidade, pressão hidrostática e flutuabilidade/empuxo, pode, portanto, não apenas ser benéfico nos programas de condicionamento físico, mas também em protocolos para recuperação pós-exercício e/ou reabilitação funcional²¹.

Os exercícios realizados no ambiente aquático quando comparado ao exercício realizado no solo, podem otimizar o aumento do processo de adaptação dos ajustes corporais que desempenham habilidades motoras variadas, aprimorando assim a qualidade do comportamento motor²².

Alguns dos efeitos terapêuticos obtidos em um programa de exercício aquático são: redução de edema, diminuição do espasmo muscular, melhora na amplitude de movimento, reeducação da marcha, independência funcional, melhora da coordenação motora global, diminuição do impacto e da descarga de peso sobre as articulações dentre outros²³.

O estudo de Dimitrijevic et al (2012) ²² relataram que os exercícios realizados na água são facilitados devido a ação da gravidade ser menor. Em adição, Torres et al. (2014) ²¹, afirmaram que o treinamento aquático também pode produzir benefício frente a reabilitação, otimizando a prevenção de danos musculares e dores após o exercício²¹.

Já Igarashi & Noagami et al (2018) ²⁴ descreveram que os exercícios aquáticos melhoraram a dor e otimizaram a flexibilidade e a força muscular.

Com relação a síntese de citocinas, Gaia Giuriato et al (2022)²⁵, demonstraram que o exercício físico aumenta as concentrações circulantes de citocinas inflamatórias específicas como a IL-6 e IL-1 β .

Ainda com relação a reabilitação do musculoesquelética, é importante destacar os efeitos positivos da utilização de recursos fototerápicos que tem demonstrado na literatura efeitos positivos tanto para regeneração quanto para processos adaptativos do tecido muscular, incluindo a HC. Neste sentido, a fotobiomodulação FBM com laser de baixa intensidade LBI já demonstrou diversos efeitos positivos em alterações musculoesqueléticas distintas, conforme já descrito na literatura ^{9-10, 35-38}.

Os efeitos da FBM ocorrem através da absorção da luz pelos fotorreceptores presentes nas células. Os fotorreceptores modulam as reações bioquímicas e fotoquímicas nas células, promovendo a transferência de elétrons da cadeia respiratória, induzindo a síntese de adenosina trifosfato ATP, esse processo é denominado como cadeia mitocondrial respiratória ³⁹.

Dentre os efeitos positivos da FBML aplicada de forma local no tecido muscular, encontram-se a modulação da resposta inflamatória, a síntese e produção de colágeno ⁴⁰⁻⁴¹ e o remodelamento da matriz extracelular MEC ⁴², além de apresentar efeitos positivos sobre os fatores regulatórios miogênicos⁴³ e sobre a angiogênese após lesão muscular aguda ⁴². Mesquita-Ferrari et al. (2011)³⁸ ao utilizarem o FBM após lesão aguda em tecido muscular, verificaram uma diminuição na expressão da citocina TNF- α após 1 e 7 dias, no grupo lesão com FBM em comparação ao grupo lesão sem FBM. Além disso, houve diminuição da citocina TGF- β aos 7 dias no grupo que recebeu a FBM em comparação ao grupo lesão sem FBM e após 14 dias houve uma diminuição significativa de TGF- β no grupo lesão com FBM em comparação ao grupo controle. Em um modelo de HC, Terena et al (2015)¹⁰, analisaram o efeito da

FBM λ 780nm, 1W/cm², 3,2 J, 80 seg, sobre os aspectos morfológicos do tecido muscular durante o processo de HC por sobrecarga em ratos Wistar e encontraram um aumento na área de secção transversa AST das fibras musculares após 14 dias. Em um outro estudo, Terena et al. (2018)³⁵, utilizando a FBM nos parâmetros: λ 780nm, 1W/cm², 3,2 J, 80 seg, aplicada em 8 pontos ao redor do músculo plantar, demonstraram que durante a HC do músculo plantar em ratos induzida por ablação de seus sinergistas (gastrocnêmio e sóleo), houve no grupo irradiado um aumento na quantidade de mionúcleos após 14 dias, aumento do colágeno no grupo irradiado após 7 dias seguido de uma diminuição após 14 dias. Observou-se ainda melhor organização das fibras colágenas nos tendões após 14 dias de irradiação ao compará-las com as fibras do grupo que não recebeu irradiação com FBM.

Martinelli et al. (2020)⁹ observaram que a FBM infravermelha λ 780nm, 1W/cm², 3,2 J, 80 seg, aplicada de forma local sobre o músculo plantar, modulou positivamente citocinas inflamatórias chaves participantes no processo de aumento e diminuição da massa muscular após 7 e 14 dias de indução da sobrecarga muscular. E Martinelli et al. (2022)¹¹, utilizando a FBML aplicada de forma local sobre o músculo plantar ou aplicada de forma vascular sistêmica (FBMV) sobre um vaso sanguíneo localizado na cauda de ratos Wistar, verificaram que a forma sistêmica aumentou a AST após sete e 14 dias. Além disso, após sete dias, observou-se um aumento no diâmetro da fibra muscular nos animais irradiados com FBMV e aos 14 dias observou-se um aumento no diâmetro da fibra em ambos os grupos irradiados, FBM e FBMV.

Assim, a compreensão de como a FBM associada ao protocolo de treinamento aquático pode interferir sobre aspectos relevantes da adaptação de um músculo exposto a uma sobrecarga funcional é importante para ampliar o entendimento sobre a ação dessas duas formas de intervenção terapêuticas muito utilizadas na reabilitação, a FBM e exercícios de resistência em meio aquático, possibilitando determinar qual protocolo de tratamento pode resultar na melhor resposta funcional do músculo plantar quando submetido a hipertrofia compensatória.

Também não há relatos dos efeitos da FBM quando aplicada de forma local associada a prática de exercícios em meio aquático sobre as citocinas inflamatórias durante o processo de hipertrofia compensatória.

Assim, de forma inédita, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do treinamento aquático e sua associação com FBM sobre a síntese de citocinas e aspectos morfológicos do músculo plantar durante processo de HC em ratos Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (protocolo CEUA nº 1664030522) e os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

ANIMAIS

Foram utilizados 26 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, Mammalia), com aproximadamente 8 semanas de vida e peso médio de 280g mantidos no biotério da (UNINOVE).

Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, em ambiente climatizado com temperatura controlada (22 a 25°C), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro) e com comida (NUTRILAB CR-1®) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo Controle Hipertrófia:** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar de forma bilateral. Não foram irradiados com FBM e não foram submetidos ao protocolo de exercícios e foram eutanasiados após 7 (n=3) e 14 dias (n=3) do início do experimento (n=6); (6 animais, 12 amostras);
- **Grupo Hipertrófia + Treinamento Aquático:** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar bilateralmente, bem como, submetidos ao protocolo de exercícios de resistência em meio aquático. Nesse grupo os animais não foram

submetidos a FBM. Os animais foram eutanasiados após 7 (n=5) e 14 (n=5) dias do início do experimento (n=20) (10 animais e 20 amostras);

- **Grupo Hipertrofia + Treinamento Aquático + FBM:** Os animais foram submetidos à ablação dos músculos sinergistas do músculo plantar bilateralmente, bem como, submetidos ao protocolo de exercícios de resistência em meio aquático. Nesse grupo os animais foram submetidos também ao protocolo FBM na região da posterior da pata esquerda. Os animais foram eutanasiados após 7 (n=5) e 14 (n=5) dias do início do experimento (n=20) (10 animais e 20 amostras)

Destacamos que no presente estudo não foi incluído o grupo hipertrofia compensatória + FBM, com o intuito de diminuir o número de animais utilizados no estudo conforme preconiza o CEUA, visto que este grupo já foi investigado em estudos anteriores em modelo de HC, que avaliaram o efeito da FBM local sobre os aspectos moleculares e morfológicos dos músculos plantares de ratos durante o processo de HC.

Fluxograma do estudo

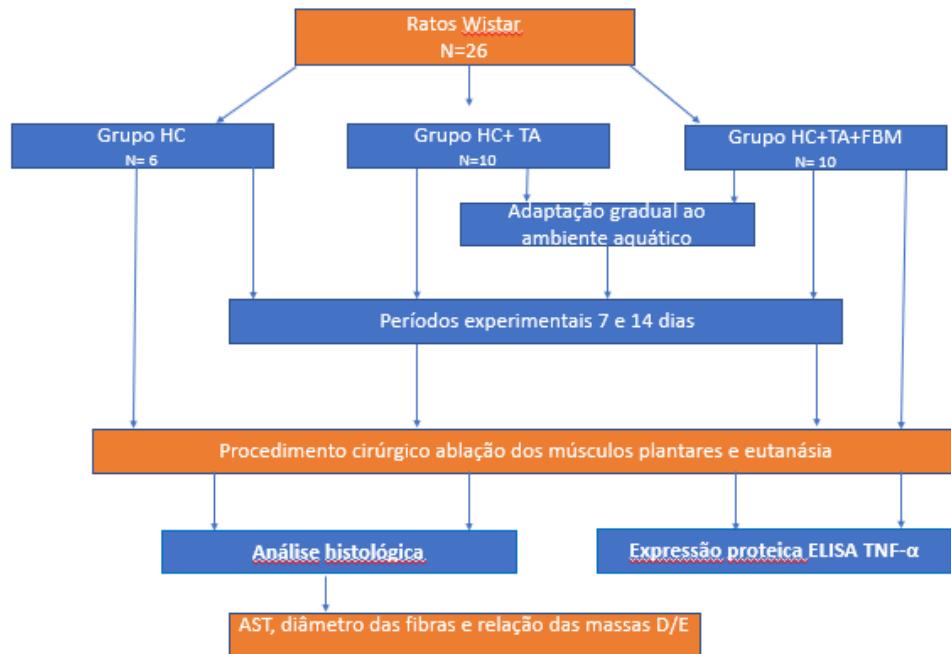


Figura 2: Fluxograma da metodologia de estudo incluindo os diferentes grupos, períodos experimentais e análises realizadas.

Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme descrito na literatura por Terada et al (2012)¹² e também descrito e utilizado por Terena et al. (2017)⁴ e Martinelli et al. (2021)⁹.

O modelo da hipertrofia utilizado no presente estudo, consiste na remoção cirúrgica dos músculos sinergistas do músculo plantar, bilateralmente, impondo uma sobrecarga de trabalho funcional sobre esse músculo^{4,9-10}. Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal a base de Ketamina 10% (0,2 mL/100g do peso do animal) (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e Xilazina 2% (0,1 mL/100g do peso do animal) (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas de modelo

insulina. Em seguida foi realizada a tricotomia seguida da incisão longitudinal na região dorsal das patas 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. O músculo plantar situado abaixo dos músculos removidos foi preservado e sofrerá a sobrecarga funcional.

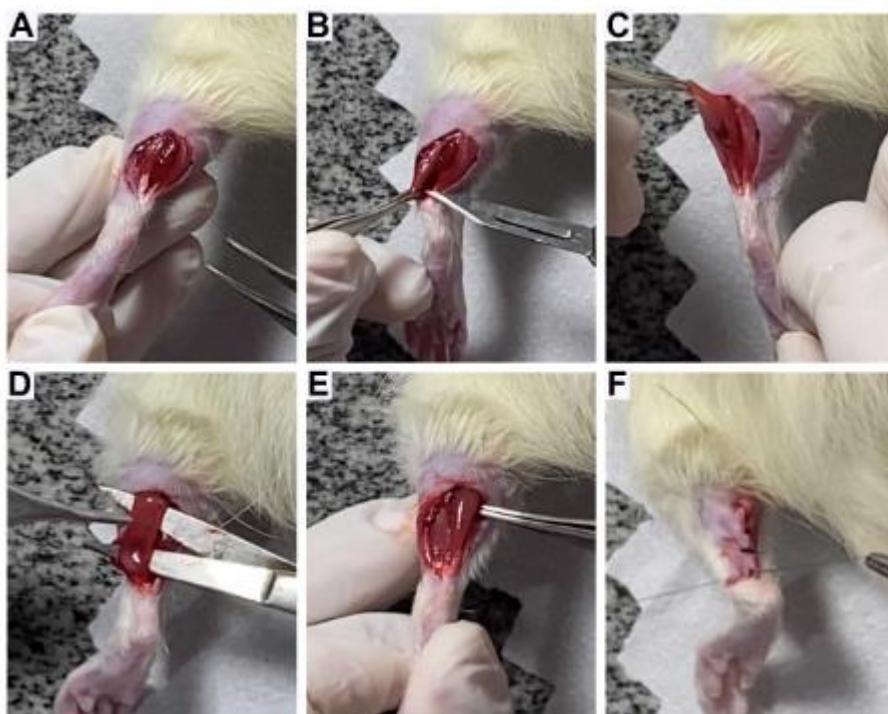


Figura 3: Procedimento cirúrgico de ablação dos sinergistas para a hipertrofia do músculo plantar. (A) incisão longitudinal da região posterior da pata traseira; (B) exposição, secção do tendão e(C) retirada parcial do m. gastrocnêmio lateral (D) retirada parcial do ventre muscular do m. gastrocnêmio medial; (E) ablação do músculo sóleo; (F) sutura na área da incisão. Fonte do próprio autor.

Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida Ethicon® e os animais foram mantidos em gaiolas.

A superfície ocular dos animais foi lubrificada com gaze embebida em soro fisiológico (NaCl 0,9%) para evitar o ressecamento ocular. Os animais foram mantidos em caixas plásticas sobre colchonete aquecido (36-37°C) para

evitar hipotermia e permaneceram sob observação até estarem livres do efeito dos anestésicos.

Com o objetivo de diminuir a sensibilidade dolorosa 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.

Protocolo de Treinamento Aquático

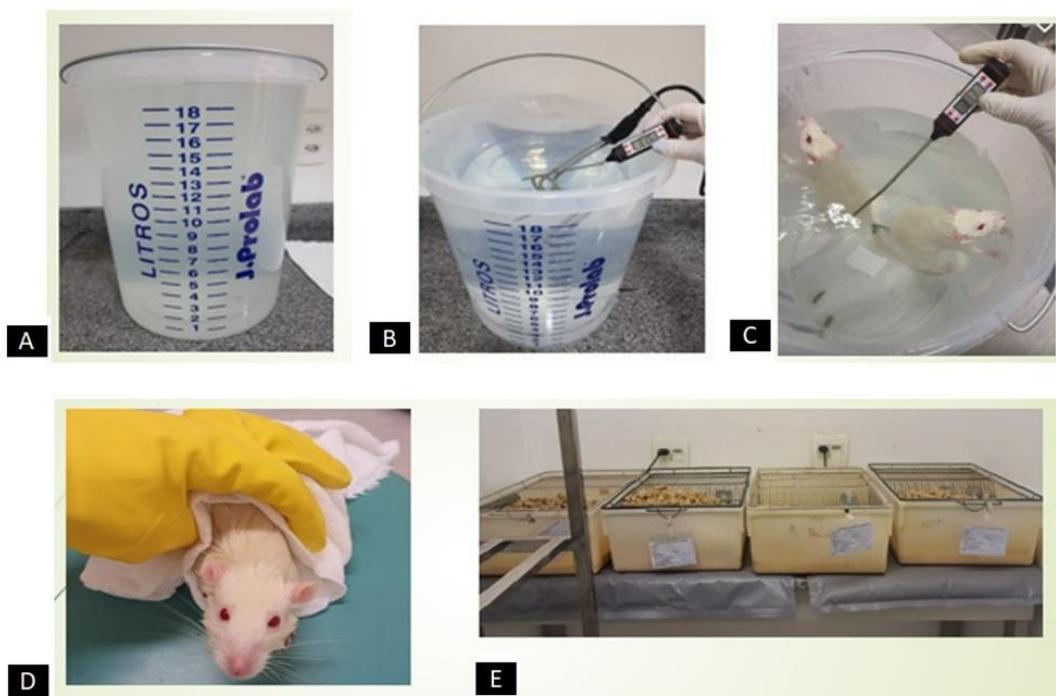
O protocolo de treinamento aquático foi realizado de acordo com o descrito por Beasi et al (2021)⁴⁴. Dessa forma, foi utilizado tanque de cloreto de polivinila PVC (35cm x 30cm x 30cm) com alça metálica e galvanizada, graduado em silk-screen marcando de (1L a 18L) e sendo preenchido com água até 20L de água 31+/-1° aquecida com aquecedor portátil de água (ebulidor) e controlada com termômetro digital de uso culinário, e com uma profundidade de 20 cm. Durante a realização do protocolo de treinamento não foi imposta carga alguma sobre o corpo do animal. Na semana anterior ao procedimento cirúrgico para indução da hipertrofia compensatória, os animais foram submetidos a adaptação ao ambiente aquático e ao treinamento adaptativo da prática de exercício com aumento gradativo do tempo de treinamento. As sessões de adaptação foram de 15 min no primeiro dia, 30 min no segundo dia, 45 min no terceiro dia e a partir do quarto dia todas as sessões tiveram duração de 60 minutos.

O treinamento efetivo ocorreu nos dias 3 a 7 após a indução da hipertrofia compensatória nos grupos avaliados em 7 dias e nos dias 3 a 7 e 10 a 14 nos grupos avaliados em 14 dias, sempre no mesmo horário e a cada 24h. Os animais do grupo HC + TA e grupo HC + TA + FBM, realizaram o treinamento por 5 ou 10 sessões de 60 min cada, de acordo com o período experimental de cada grupo que foi de 7 ou 14 dias. Durante o período de realização do exercício aquático, um pesquisador permaneceu observando o movimento dos animais durante todo o treinamento, para se certificar que não houve períodos de inatividade no tanque. Ao término das sessões do protocolo de TA os animais foram secos e aquecidos e retornaram as gaiolas. O dia da cirurgia foi considerado o dia zero e nesse dia não houve treinamento. Nos dias

1 e 2 os animais avaliados em 7 e 14 dias, não foram submetidos ao protocolo de TA afim de preservar o local da cirurgia. Nos dias 3 a 7 os animais realizaram o protocolo de TA, totalizando 5 dias de TA. No sétimo dia foi o término do protocolo experimental dos animais dos grupos avaliados em 7 dias.

Assim, após a última sessão de treinamento dos grupos avaliados por 7 dias, os animais foram eutanasiados. Em sequência ao período experimental, os animais dos grupos avaliados em 14 dias não realizaram treinamento nos dias 8 e 9. Nos dias 10 a 14, os animais realizaram o TA totalizando 10 dias de treinamento. No décimo quarto dia após a última sessão de treinamento, os animais foram eutanasiados.

Imagens do Protocolo do Treinamento Aquático (TA)



Figuras 4: (A) Dispositivo de TA preenchido com água; (B) Uso do ebulidor e termômetro; (C) Animais realizando o protocolo de TA e a demonstração da aferição de temperatura da água; (D) Secagem manual e individual dos animais; (E) Acomodação dos animais em suas gaiolas sobre manta térmica. **Fonte do próprio autor.**

Protocolo de Fotobiomodulação

Os animais do grupo HC + TA + FBM foram irradiados diariamente com LBI após a realização do protocolo de TA com os parâmetros baseados em estudos prévios^{9,11,35} conforme descritos na tabela 1, utilizando o equipamento de LBI TwinLaser, MMOptics, São Carlos, Brasil. A irradiação foi unilateral (pata esquerda), diariamente até o término do período experimental 7 ou 14 dias. Para evitar refração do feixe do laser aplicação será realizada no ângulo de 90°C entre o emissor e a pele do animal (aplicação perpendicular). No início e final do procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser será aferida utilizando o Laser Checkpower meter (MM Optics, São Carlos SP, Brasil).

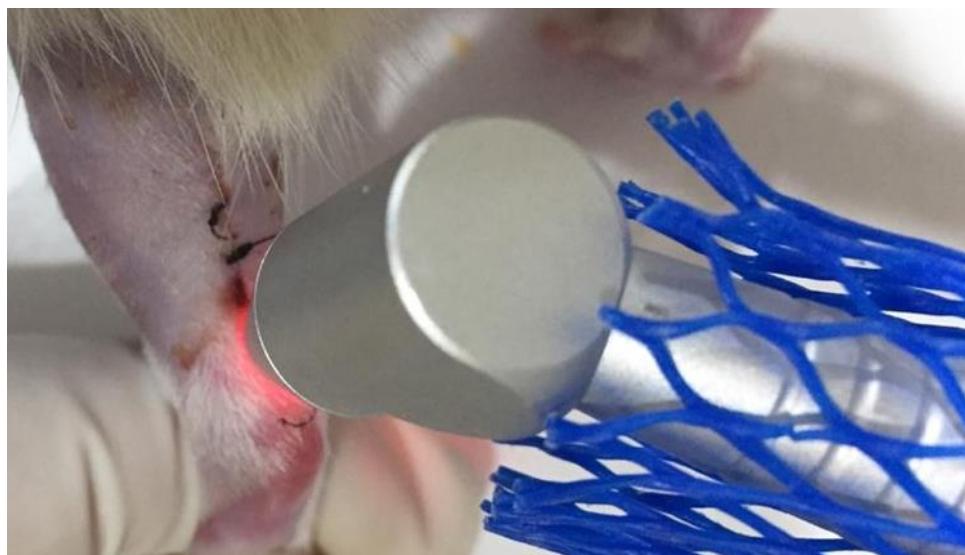


Figura 5: Procedimento de irradiação com LBI aplicado ao redor da sutura na região da pele que recobre o músculo plantar. **Fonte do próprio autor.**

Tabela 1: Parâmetros dosimétricos utilizados na irradiação

| Meio ativo | Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) |
|-----------------------|---------------------------------------|
| Comprimento de onda | 780 nm |
| Área do feixe | 0,04 cm ² |
| Potência média | 40 mW |
| Densidade de potência | 1 W/cm ² |

| | |
|---------------------------|----------------------|
| Exposição radiante | 10 J/cm ² |
| Energia por ponto | 0.4 J |
| Total de pontos | 8 pontos |
| Tempo por ponto | 10 segundos |
| Tempo total | 80 segundos |
| Energia total | 3.2 J |

Procedimento de eutanásia e coleta do material

Após o período experimental de cada grupo 7 e 14 dias, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (2x a dose aplicada para a anestesia), foi realizada assepsia, tricotomia, incisão para exposição total e remoção dos músculos plantares. Os músculos plantares foram coletados e imediatamente pesados para análise da relação da massa muscular em comparação ao peso corpóreo do animal. Os músculos também foram utilizados para a análises da expressão proteica de TNF- α , através do teste de ELISA, utilizando o kit comercial (R&D System, Minneapolis, EUA). e para análise histológica por técnica de HE.

Análise da massa muscular

Após a eutanásia dos animais nos diferentes períodos de análise, os músculos plantares direito e esquerdo foram cuidadosamente removidos por meio da ressecção do tendão de origem e da inserção óssea e limpos conforme descrito anteriormente. Os músculos foram pesados em uma balança semi-analítica e para cada animal foi calculada a relação de massa muscular em comparação ao peso corpóreo do animal usando a seguinte fórmula:

usando a seguinte fórmula:

$$r = \frac{m}{PC}$$

Sendo:

r: relação de massa muscular

m: massa muscular

PC: peso corporal

Para essa análise foram coletados os dados de 3 animais no grupo HC e 5 animais dos grupos HC + TA e grupo HC + TA + FBM.

Análise de expressão proteica: ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Amostras dos músculos plantares também foram submetidas a análise de expressão proteica da citocina TNF- α . Para isso, os músculos foram pesados e homogeneizados (Fisher Scientific® PowerGen 125) com tampão de extração RIPA e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0.1 mM. Em seguida, o extrato tecidual foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a -80°C até o momento da análise. A quantificação de proteína total nas amostras será realizada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), com comprimento de onda de (260 e 280) nm. Os níveis de TNF- α , no extrato do músculo plantar dos animais foram avaliadas através do ensaio imunoenzimático ELISA, seguindo recomendações do kit comercial (R&D System, Minneapolis, EUA). Para essa análise foram coletados os dados de 3 animais do grupo HC e 5 animais dos grupos HC + TA e grupo HC + TA + FBM.

Análise histológica do tecido muscular

As amostras musculares foram também utilizadas para análise morfológica e para este procedimento 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, passados três vezes em álcool absoluto e

três vezes em Xitol (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) para serem avaliados os seguintes aspectos morfológicos: diâmetro das fibras musculares e área de secção transversa AST.

Para permitir a análise quantitativa destes aspectos foram consideradas 3 áreas por lâmina de 3 animais/grupo. 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.

Análise de Resultados

Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e foram expressos em média e desvio-padrão se aderirem à curva de Gauss ou mediana e intervalo interquartílico se não aderirem. A comparação entre os grupos foi realizada pela ANOVA se os dados forem paramétricos ou pelo Kruskal-Wallis se não paramétricos. O Teste de contraste (Pós-Hoc) utilizado será 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).

RESULTADOS

Análise da relação da massa muscular e peso corporal

Os resultados da análise de massa muscular e peso corporal demonstraram que não houve diferença significante entre os grupos Controle HC, HC + TA e HC + TA + FBM após 7 e 14 dias. (Figura 6 A e B).

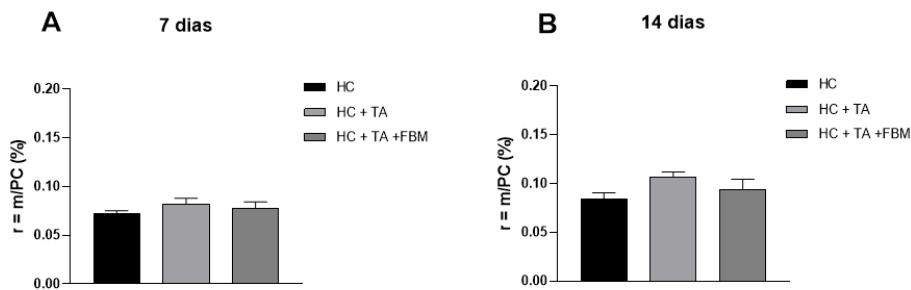


Figura 6. Valores Médios \pm erro padrão da média da massa muscular dos músculos plantares em relação ao peso corporal dos animais dos diferentes grupos após 7 e 14 de HC. (ANOVA/Tukey).

Expressão proteica de TNF- α por ELISA

Os resultados da expressão proteica de TNF- α após 7 dias demonstraram que houve redução nos níveis desta citocina no grupo HC+TA + FBM, quando comparado ao grupo Controle HC ($p = 0,049$). Neste período, não houve diferença na expressão proteica de TNF- α entre os grupos HC +TA e grupo HC+ TA+FBM. Após 14 dias não foram encontradas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. Figura (7 A e B).

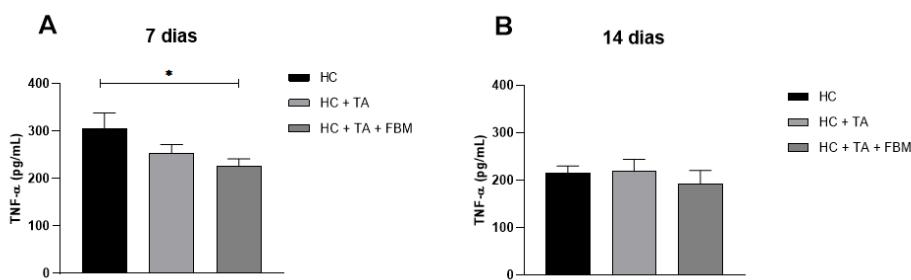


Figura 7. Valores Médios \pm erro padrão da expressão proteica da citocina TNF- α nos diferentes grupos, no período experimental de 7 e 14 dias. (ANOVA/Tukey), * $p<0,05$.

Análise dos aspectos morfológicos por H&E

Análise qualitativa dos cortes histológicos é possível verificar em 7 e 14 dias um aumento da AST e um aumento do diâmetro das fibras após 14 dias no grupo que recebeu o tratamento com FBM.

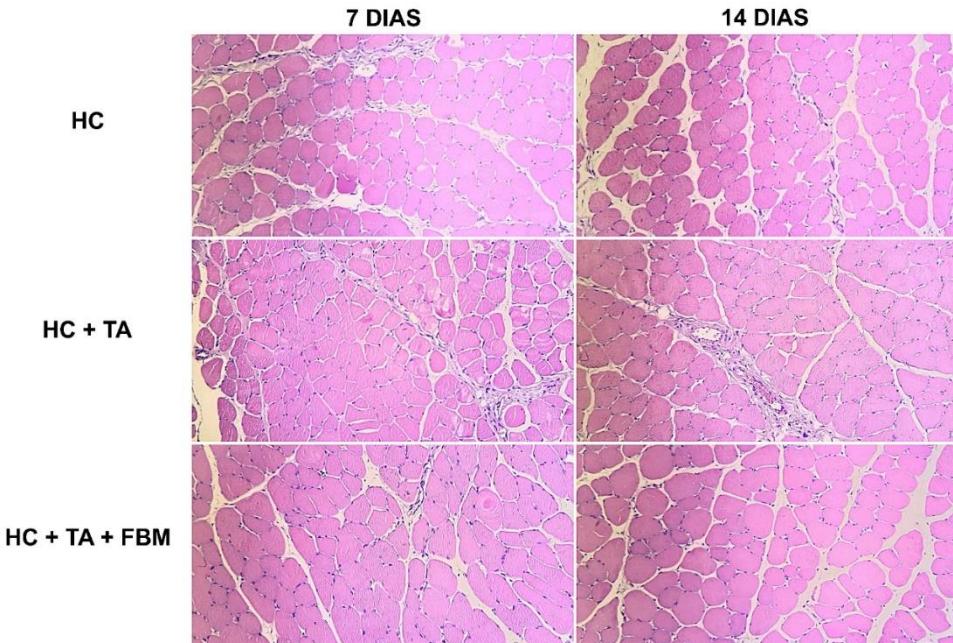


Figura 8: Cortes histológicos transversais dos músculos plantares corados com hematoxilina e eosina (400X); grupo controle HC, grupo HC + TA e grupo HC + TA + FBM.

Hipertrofia das fibras musculares

Os resultados da análise quantitativa da AST das fibras musculares demonstraram maiores valores de área após 7 dias no grupo HC+ TA+FBM, quando comparado ao grupo HC+TA ($p = 0,0002$) e menores valores de área no grupo HC+TA quando comparado ao grupo Controle HC ($p = 0,003$). Após 14 dias maiores valores de área foi observado no grupo HC+TA+FBM quando comparado ao grupo HC + TA ($p = 0,006$). (Figura 9 A e B).

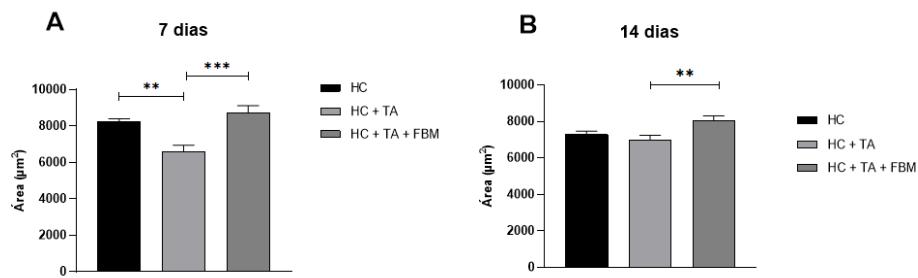


Figura 9. Valores Médios \pm erro padrão da área de secção transversa (AST) nos diferentes grupos, após 7 e 14 dias. (ANOVA/ Tukey), ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Os resultados da análise quantitativa do diâmetro das fibras demonstraram que após 7 dias não houve diferença entre os grupos experimentais. Após 14 dias houve um aumento no diâmetro das fibras musculares nos grupos HC + TA + FBM quando comparados ao grupo HC ($p = 0,009$) e HC + TA ($p = 0,006$). (Figura 10 A e B).

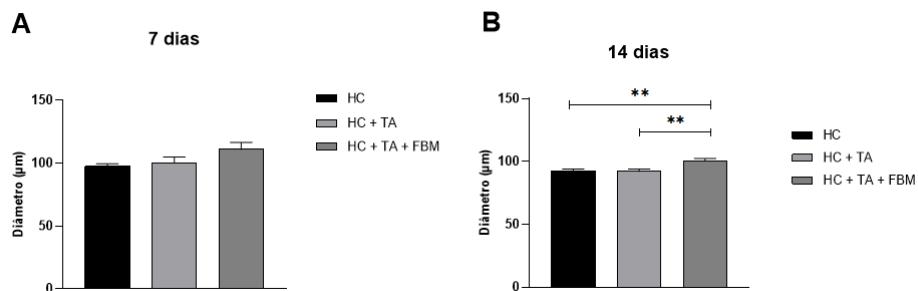


Figura 10. Valores Médios \pm erro padrão de histologia dos diâmetros das fibras nos diferentes grupos, no período experimental de 7 e 14 dias. (ANOVA/ Tukey), ** $p<0,01$.

5. DISCUSSÃO

Nos centros de reabilitação funcional, o primeiro objetivo dos profissionais que atuam frente à essas situações de comprometimento muscular é recuperar o músculo, a fim de garantir a funcionalidade do indivíduo. Nesse contexto, a prática de exercícios físicos pode ser considerada como uma das principais intervenções terapêuticas que contribuem na melhora física dos indivíduos com comprometimento muscular¹⁹.

Outro recurso terapêutico que tem demonstrado excelente capacidade modulatória no processo de reabilitação de lesões ou comprometimento muscular é a FBM com LBI. A literatura destaca inúmeros estudos que relatam efeitos positivos da FBM em diferentes fases de reabilitação do músculo após lesões aguda^{38,41,42,43}, após lesão nervosa periférica (LNP)^{49,50}, durante a indução de hipertrofia^{9,10,11,35} entre outros. Assim, a FBM vem ganhando cada vez mais destaque como opção de tratamento quando se busca a melhora funcional de um músculo acometido por diferentes tipos de lesões.

Diversos estudos envolvendo modelos experimentais, buscam entender como ocorre o processo adaptativo do músculo esquelético em diferentes situações a que esse tecido pode ser exposto. Com base nesses estudos, é possível mimetizar o que comumente observa-se na prática clínica. Assim, nesse estudo utilizamos o modelo de HC do músculo plantar de ratos Wistar já que este é um modelo bem estabelecido e caracterizado na literatura³⁵ e permite avaliar a resposta de adaptação do músculo plantar quando exposto a uma sobrecarga funcional em um período de poucos dias^{4,9,10,11} bem como permite a associação com protocolo de TA.

Assim no presente estudo buscou-se avaliar a associação destes recursos terapêuticos muito utilizados para a reabilitação muscular de forma a entender a interação entre eles e possível otimização de seus efeitos positivos que já foram evidenciados quando utilizados separadamente. Desta forma, avaliou-se os efeitos FBM associado ao TA sobre os aspectos moleculares e morfológicos do músculo plantar durante processo de HC em ratos Wistar.

De acordo com os resultados obtidos na análise de expressão proteica, observou-se que após 7 dias, houve redução nos níveis de TNF- α no grupo HC+TA+FBM, quando comparado ao grupo Controle + HC. No período

experimental de 14 dias não houve alterações na expressão proteica de TNF- α em nenhum dos grupos experimentais.

Um estudo anterior utilizando o mesmo modelo experimental de HC e aplicando a FBM infravermelha, também demonstrou que após 14 dias de HC não houve diferença na expressão proteica de TNF- α entre os diferentes grupos experimentais⁹. Considerando que o TNF- α quando expresso no músculo pode sinalizar um dano tecidual, bem como um comprometimento no processo de reparo do tecido e prejuízo a manutenção de massa muscular^{9,32,33}, o achado do presente estudo sugere que ambos os recursos terapêuticos embora não promoveram a redução dessa citocina após 14 dias, também não influenciaram de forma negativa, uma vez que os níveis proteicos de TNF- α nos grupos submetidos ao protocolo de TA ou ao protocolo de TA+FBM não aumentaram após 14 dias de avaliação. Dessa forma, tanto o TA quanto a associação deste com a FBM, demonstraram não produzirem efeitos deletérios ao músculo quando submetido a uma sobrecarga funcional excessiva em um período de até 14 dias. Esta redução na expressão proteica de TNF- α no grupo HC+TA+FBM após 7 dias, sugere um efeito positivo da associação do protocolo de TA e da irradiação com LBI sobre a regulação da expressão de citocinas como o TNF- α , visto que no presente estudo o grupo HC que não realizou o TA e não recebeu a FBM apresentou um aumento na expressão dessa citocina. De acordo com a literatura, o TNF- α é uma citocina com característica pró-inflamatória, e quando expressa no tecido muscular pode influenciar na ausência de proteção do tecido, além de promover a diminuição do volume de massa muscular, bem como a apoptose celular. Frente a essas alterações poderão ocorrer a diminuição da AST das fibras e menor capacidade de resposta ao exercício físico. Martinelli et al. (2020)⁹ ao utilizarem o mesmo modelo de indução HC do músculo plantar em ratos Wistar e imediatamente após a indução utilizaram a FBM (780 nm, 10 J/cm², 40 mW, e 3.2 J/cm² de energia total) e observaram uma redução da expressão proteica de TNF- α após 7 dias. Esse achado evidencia o papel da FBM na redução desta citocina uma vez que somente o TA (grupo HC+TA) não foi capaz de induzir esta redução sendo os níveis semelhantes ao grupo somente HC.

Outros estudos também observaram efeitos similares da FBM sobre a expressão de TNF- α em diferentes modelos experimentais⁴⁷⁻⁴⁸. Leal Junior et

al. (2014)⁴⁷, aplicaram a FBM (904 nm, densidade de potência 75 mW/cm², potência média de 15 mW, energia de 1,0J; tempo de 67 segundos) em camundongos mdx em um modelo de distrofia muscular e verificaram uma diminuição de expressão gênica de TNF- α após a realização de um protocolo de 14 semanas de irradiações com frequência de 5 irradiações por semana, sugerindo assim um efeito protetor da FBM quando utilizada sobre o tecido muscular exposto a uma condição perda de massa muscular. Mesquita-Ferrari et al. (2011)³⁸ utilizando um modelo de lesão muscular aguda em ratos Wistar e utilizando c a FBM com os mesmos parâmetros estabelecidos no presente estudo, também verificaram a redução na expressão da citocina TNF- α após 1 e 7 dias, os autores associaram essa redução à melhora do reparo tecidual. Juntos, esses achados corroboram com os presentes achados e confirmam a hipótese do que a FBM associada ao exercício físico realizado em meio aquático e a FBM podem favorecer a adaptação do tecido muscular por inibir o aumento de citocinas que podem de forma negativa no aumento da massa muscular e por consequência interferir também na funcionalidade do músculo.

Quanto a análise histológica da AST, os resultados permitiram observar em 7 dias áreas menores das fibras musculares no grupo HC+TA em relação ao grupo somente HC. Contudo, um aumento da área das fibras foi observado no grupo submetido a HC +TA +FBM no mesmo período. Aos 14 dias, também houve um aumento na AST das fibras musculares nos animais submetidos a HC+TA+FBM, quando comparado ao grupo HC+TA. De acordo com esses resultados, a prática do TA isolada não induziu o aumento da AST principalmente no intervalo de 7 dias. Após 14 dias, embora não tenha ocorrido um aumento, também não se evidenciou a redução do tamanho da fibra, esse achado supõe que em 14 dias o TA pode auxiliar na manutenção do tamanho da fibra muscular já que nesse período não se observou a mesma redução. Em adição, o grupo submetido a HC+TA+FBM demonstrou um aumento na AST das fibras musculares tanto em 7 como em 14 dias, ressaltando a excelente capacidade da FBM quando associada ao TA em atuar como um recurso terapêutico capaz de aumentar a AST das fibras musculares durante o período de maior aumento de massa muscular no processo de HC. A FBM também se mostrou eficaz em aumentar a AST em estudos prévios como após LNP e lesão medular (LM). Andreo et al (2020)^{49,50}, usando a FBM com os mesmos

parâmetros ($\lambda = 780$ nm, 10 J/cm², 40 mW, e 3.2 J/cm² de energia total), em um modelo de lesão nervosa periférica em ratos, realizando a aplicação da FBM sobre o músculo tibial anterior ou sobre o nervo ciático, ou ainda realizando a aplicação sobre o músculo e sobre o nervo de forma simultânea, encontraram um aumento da AST e do diâmetro das fibras musculares após 21 e 28 dias de irradiações diárias.

Em adição, Tobelem et al. (2022)⁵³, avaliaram os efeitos da FBM infravermelha, aplicada de forma vascular, por 35 dias, sobre os aspectos morfológicos do músculo tibial anterior em um modelo de lesão medular e observaram que a FBM infravermelha aplicada de forma precoce, isto é, aplicada imediatamente após a indução da LM e após 2h, apresentaram um aumento da AST a partir da segunda semana de tratamento quando comparadas as fibras dos grupos não tratados com FBM.

Com relação a análise do diâmetro das fibras musculares, os resultados demonstraram que em 7 dias não houve diferença entre os grupos experimentais. Entretanto, em 14 dias um aumento do diâmetro das fibras musculares foi observado em ambos os grupos que receberam algum tipo de intervenção terapêutica quando comparados ao grupo controle, esses achados destacam o benefício tanto do TA quanto da FBM no aumento do diâmetro das fibras musculares. Diversos estudos anteriores relataram a eficácia da FBM em atuar sobre o tecido muscular frente as distintas situações a que esse tecido pode ser exposto^{42,9,49} No que diz respeito a HC, alguns estudos dedicaram-se a avaliar a atuação apenas da FBM, sem a associação de qualquer tipo de exercício físico, e assim como no presente estudo, evidenciaram um efeito positivo dessa terapia em promover o aumento do diâmetro e da AST das fibras musculares. Martinelli et al. (2022)¹¹, usando FBM ($\lambda = 780$ nm, 10 J/cm², 40 mW, e 3.2 J/cm² de energia total), aplicada de forma local sobre a região do músculo plantar ou de forma vascular aplicada sobre um vaso sanguíneo de grosso calibre localizado na cauda do animal em um modelo de HC unilateral do músculo plantar semelhante ao modelo utilizado no presente estudo (HC bilateral), também encontraram um aumento da AST da fibra induzida pela aplicação vascular da FBM após 14 dias de irradiações. O mesmo estudo, também evidenciou um aumento do diâmetro das fibras em após 7 e 14 dias. Os autores relataram que ambas as formas de aplicação contribuíram para o

aumento da área e do diâmetro das fibras musculares favorecendo assim o processo de HC.

Utilizando o mesmo modelo de HC do músculo plantar descrito no presente estudo e o mesmo protocolo de FBM infravermelha ($\lambda = 780$ nm, 10 J/cm², 40 mW, e 3.2 J/cm² de energia total), aplicada de forma local sobre o músculo plantar, Terena et al. (2015)¹⁰, também encontraram um aumento da AST da fibra após 14 dias de irradiações como observado nos grupos HC+TA e HC+TA+FBM.

Outros estudos também relataram que tanto a FBM local quanto a FBM vascular promoveram efeitos positivos sobre os aspectos morfológicos do músculo e sobre o processo de reparo do tecido. Lopes et al (2021)⁵¹, ao induzir uma lesão muscular aguda *in vivo*, verificaram que a FBM vascular ($\lambda = 780$ nm, 40 mW, 3,2 J, sendo 1 ponto de aplicação sobre um vaso sanguíneo localizado na cauda do animal durante 80s), reduziu da área da lesão muscular após 5 e 7 dias, reduziu o edema após 5 dias além de promover a formação de novas fibras musculares após 7 dias.

Estudos prévios destacam a importância tanto dos exercícios físicos quanto da FBM na resposta de adaptação, reparo e reabilitação do músculo esquelético após quaisquer demandas de sobrecarga, lesão tecidual ou mesmo lesão nervosa ^{9,11,40,42}. Especificamente sobre os exercícios físicos realizados em meio aquático, a literatura relata sua capacidade em otimizar a adaptação dos ajustes corporais responsáveis por diversas habilidades motoras²². Além disso, estudos anteriores relataram que tais exercícios podem interferir de maneira positiva no processo de reabilitação das desordens musculares por otimizar a flexibilidade e a força muscular e prevenindo danos musculares após a prática de exercícios^{22,23,24}. Da mesma forma muitos estudos enfatizam o uso da FBM como uma terapia promissora, capaz de modular o músculo esquelético, promovendo seu reparo e melhorando o processo de adaptação necessária para gerar uma adequada resposta após os acometimentos que cursem com perda da funcionalidade do músculo^{9,10,11}. Somando-se a esses achados prévios, no presente estudo, as duas intervenções, (TA e FBM), principalmente quando associadas, mostraram-se capaz de influenciar no aumento da fibra muscular.

Os resultados da análise da relação de massa muscular demonstraram que não houve diferença entre os grupos Controle HC, HC +TA e HC + FBM em nenhum dos períodos experimentais.

Alguns estudos utilizando o mesmo modelo de HC associado a terapia com FBM, porém sem a execução do protocolo de treinamento aquático, avaliaram os efeitos da FBM sobre a relação de massa muscular após a indução da HC. Terena et al. (2015)¹⁰, utilizando o modelo de HC em ratos Wistar e utilizando a FBM infravermelha ($\lambda = 780$ nm, 10 J/cm², 40 mW, e 3.2 J/cm² de energia total), aplicada em 8 pontos sobre o músculo plantar, assim como no presente estudo não encontraram um aumento do peso do músculo quando comparado ao peso corpóreo dos animais após 7 dias de sobrecarga muscular e de tratamento com FBM. Porém, após 14 dias de sobrecarga os autores observaram um aumento da massa muscular nos grupos que receberam ou não a FBM. Já Martinelli et al (2022)¹¹, submeteram o músculo plantar de ratos Wistar a HC e aplicaram a FBM ($\lambda = 780$ nm, 10 J/cm², 40 mW, e 3.2 J/cm² de energia total), sobre o músculo plantar ou sobre a cauda dos animais (aplicação vascular), por 7 ou 14 dias. Em seguida, compararam a massa dos músculos utilizando a relação esquerdo e direito (E/D) dos membros de cada músculo para determinar a relação de massa entre o músculo que recebeu a sobrecarga e o músculo que não recebeu sobrecarga. O estudo relatou que em 7 dias não houve diferença no volume de massa muscular entre os grupos submetidos HC tratados ou não com FBM. Contudo, após 14 dias de irradiações, observou-se que a massa muscular dos grupos que não recebeu a FBM e do grupo tratado com FBM local, diminuiu quando comparados ao controle. Por outro lado, o grupo tratado com FBM vascular manteve sua massa muscular semelhante a massa muscular do grupo controle.

Um outro estudo, aplicou a FBM vermelha ($\lambda = 660$ nm, 50 mW, 2 min, durante 10 dias) em um modelo de lesão nervosa periférica, e demonstraram que os animais tratados com FBM apresentaram um aumento da massa muscular ao término do protocolo experimental⁵².

Esses achados diferem em parte dos resultados apresentados no presente estudo. De acordo com os resultados aqui obtidos, é possível sugerir que embora o TA e a FBM não aumentaram a massa muscular, também não demonstraram ser terapias que atuem de forma negativa sobre o músculo, no

sentido de promover a redução do volume da massa muscular após uma sobrecarga. Isso porque, em nenhum momento os grupos tratados com FBM e/ou TA evidenciaram a redução da massa muscular quando comparados ao grupo controle.

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a associação da FBM e TA induziram os melhores efeitos durante a HC do músculo plantar quando comparado ao TA isolado, incluindo a redução de TNF- α , e o aumento da AST e do diâmetro das fibras musculares. Além disso, o TA isoladamente também foi benéfico para o tecido muscular, uma vez que induziu manutenção do diâmetro das fibras. Esses resultados são extremamente relevantes quando se considera as diferentes possibilidades de intervenção terapêutica ou a associação de ambas as terapias que se mostraram capazes de atuar de forma positiva no tratamento das desordens musculares comumente observadas em músculos que sofram uma sobrecarga excessiva como ocorre na HC.

Limitações de estudo e perspectivas futuras

No presente estudo nos limitamos a estabelecer um protocolo de treinamento aquático (TA), com base em um único estudo, isso devido a divergência e inconsistência dos dados metodológicos relatados nos estudos encontrados na literatura que não permitem a reprodução adequada do método. Assim, outros estudos deverão ser realizados a fim de somar-se aos nossos achados, bem como, a fim de preencher a lacuna científica sobre as divergências encontradas na literatura, no que diz respeito a reprodução de protocolo de TA, permitindo assim padronizar um protocolo adequado, prático e confiável, tal como estabelecemos no presente estudo.

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. Greising SM, Corona BT, Call JA. Musculoskeletal Regeneration, Rehabilitation, and Plasticity Following Traumatic Injury. *Int J Sports Med.* 2020 Jul;41(8):495-504. doi: 10.1055/a-1128-7128. Epub 2020 Apr 2. PMID: 32242332.
3. 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.
4. Terena SML, Fernandes KPS, Bussadori SK, Deana AM, Mesquita-Ferrari RA. Systematic review of the synergist muscle ablation model for compensatory hypertrophy. *Ver. Assoc Med Bras.* 2017; 63 (2): 164 – 72.
5. Phillips, Stuart M. "A brief review of critical processes in exercise-induced muscular hypertrophy." *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* vol. 44 Suppl 1,Suppl 1 (2014): S71-7. doi:10.1007/s40279-014-0152-3
6. Bazgir B, Fathi R, Rezazadeh Valojerdi M, Mozdziak P, Asgari A. Satellite Cells Contribution to Exercise Mediated Muscle Hypertrophy and Repair. *Cell J.* 2017 Winter;18(4):473-484. doi: 10.22074/cellj.2016.4714. Epub 2016 Sep 26. PMID: 28042532; PMCID: PMC5086326.
7. 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.
8. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280:4294–314.
9. 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.* 2020;36(4):791-802.
10. Terena SML, Fernandes KPS, Kalil S, Alves AN, Mesquita Ferrari RA. Effects of low-level 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
11. Martinelli A, Andreo L, Dos Santos Malavazzi TC, Terena SML, da Cruz Tobelem D, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Vascular photobiomodulation increases muscle fiber diameter and improves the gait during compensatory hypertrophy of plantar muscle in rats. *J Biophotonics.* 2022. Aug 27:e202200192. doi: 10.1002/jbio.202200192.
 12. Terada M, Kawano F, Ohira T, Nakai N, Nishimoto N. Effects of Mechanical Over-Loading on the Properties of Soleus Muscle Fibers, with or without Damage, in Wild Type and Mdx Mice. *PLoS One.* 2012;7(4).
 13. Miyazaki M, Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol.* 2009;106(4):1367–73.
 14. Schuenke MD, Brooks NE, Hikida RS. Interactions of Aging, Overload, and Creatine Supplementation in Rat Plantaris Muscle. *J Aging Res.* 2011;2011: 393–416.
 15. Huey KA, Burdette S, Zhong H, Roy RR. Early response of heat shock proteins to functional overload of the soleus and plantaris in rats and mice. *Exp Physiol.* 2010;1145–55.
 16. 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.
 17. 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 Oct;31(7):1387-1393. doi: 10.1007/s00590-021-02891-8. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33555443; PMCID: PMC8448710.
 18. Ichinose T, Yamamoto A, Kobayashi T, Shitara H, Shimoyama D, Iizuka H, Koibuchi N, Takagishi K. Compensatory hypertrophy of the teres minor muscle after large rotator cuff tear model in adult male rat. *J Shoulder Elbow Surg.* 2016 Feb;25(2):316-21. doi: 10.1016/j.jse.2015.07.023. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26422529.

19. Schoeller, Soraia Dornelles, et al. "Knowing to care: characterization of individuals with spinal cord injury treated at a rehabilitation center." *Fisioterapia em Movimento* 28 (2015): 77-83.
20. Silva AZD, Israel VL. Effects of dual-task aquatic exercises on functional mobility, balance and gait of individuals with Parkinson's disease: A randomized clinical trial with a 3-month follow-up. *Complement Ther Med.* 2019 Feb;42:119-124. doi: 10.1016/j.ctim.2018.10.023. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30670228.
21. Torres-Ronda L, Del Alcázar XS. The Properties of Water and their Applications for Training. *J Hum Kinet.* 2014 Dec 30;44:237-48. doi: 10.2478/hukin-2014-0129. PMID: 25713684; PMCID: PMC4327375.
22. Dimitrijević L, Bjelaković B, Lazović M, Stanković I, Čolović H, Kocić M, Zlatanović D. [Exercício aquático no tratamento de crianças com paralisia cerebral]. *Srp Arh Celok Lek.* 2012 Nov-Dec;140(11-12):746-50. Sérvio. doi: 10.2298/sarh1212746d. PMID: 23350249.
23. Arca, E. A., A. Fiorelli, and A. C. Rodrigues. "Hidrokinetictherapy effects in the blood pressure and on the anthropometrical measures in hypertensive women." *Braz J Phys Ther (Impr)* 8 (2004): 279-283.
24. Yutaka Igarashi, Yoshie Nogami, The effect of regular aquatic exercise on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials, European Journal of Preventive Cardiology, Volume 25, Issue 2, 1 January 2018, Pages 190–199, <https://doi.org/10.1177/2047487317731164>
25. Giuriato, G., Venturelli, M., Matias, A., Soares, E., Gaetgens, J., Frederick, K. A., & Ives, S. J. (2022). Capsaicin and Its Effect on Exercise Performance, Fatigue and Inflammation after Exercise. *Nutrients*, 14(2), 232. <https://doi.org/10.3390/nu14020232>.
26. Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman DC. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21:8-25. PMID: 25826432.
27. Cheung WW, Zheng R, Hao S, Wang Z, Gonzalez A, Zhou P, Hoffman HM, Mak RH. The role of IL-1 in adipose browning and muscle wasting in CKD-associated cachexia. *Sci Rep.* 2021 Jul 23;11(1):15141. doi: 10.1038/s41598-021-94565-y. PMID: 34302016; PMCID: PMC8302616.

28. Benny Klimek ME, Sali A, Rayavarapu S, Van der Meulen JH, Nagaraju K. Effect of the IL-1 Receptor Antagonist Kineret® on Disease Phenotype in mdx Mice. *PLoS One.* 2016 May 23;11(5):e0155944. doi: 10.1371/journal.pone.0155944. PMID: 27213537; PMCID: PMC4877010.
29. Gao S, Durstine J L, Koh H J, Carver W E, Frizzell N, Carson J A (2017) Acute myotube protein synthesis regulation by IL-6 related cytokines. *AMJ Physiol Cell Physiol* 313: 487 – 500.
30. Pedersen BK, Febbraio MA (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8:457–465. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49>.
31. Costa EM da, Werutsky CA. IL-6: Sinalização na Hipertrofia Muscular e efeitos Metabólicos Sistêmicos. *Int J Nutrology.* 2015;8(4):95–100.
32. Patel HJ, Patel BM (2017) TNF- α and cancer cachexia: molecular insights and clinical implications. *Life Sci* 170:56–63. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.11.033>
33. Lin HP, Zheng YQ, Zhou ZP, Wang GX, Guo PF. Ryanodine receptor antagonism alleviates skeletal muscle ischemia reperfusion injury by modulating TNF- α and IL-10. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;70(1):51–58. doi: 10.3233/CH-170276. PMID: 29660904.
34. Braun TP, Zhu X, Szumowski M, Scott GD, Grossberg AJ, Levasseur PR, Graham K, Khan S, Damaraju S, Colmers WF, Baracos VE, Marks DL. Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Exp Med.* 2011 Nov 21;208(12):2449–63. doi: 10.1084/jem.20111020. Epub 2011 Nov 14. PMID: 22084407; PMCID: PMC3256966.
35. Terena, Stella Maris Lins, et al. "Infrared laser improves collagen organization in muscle and tendon tissue during the process of compensatory overload." *Photomedicine and laser surgery* 36.3 (2018): 130-136.
36. Shepherd DW, Norris JM, Simpson BS, Player DJ, Whitaker HC. Effects of photobiomodulation therapy on regulation of myogenic regulatory factor mRNA expression in vivo: A systematic review. *J Biophotonics.* 2022 Feb;15(2): e202100219. doi: 10.1002/jbio.202100219. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34799996.

37. Dourado, D. M., et al. "The effects of low-level laser on muscle damage caused by Bothrops neuwiedi venom." *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 14.3 (2008): 423-434.
38. Mesquita-Ferrari, Raquel Agnelli, et al. "Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process." *Lasers in Medical Science* 26.3 (2011): 335-340
39. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol*. 2008 Sep-Oct;84(5):1091-9. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x. Epub 2008 Jul 18. PMID: 18651871.
40. Alves AN, Fernandes KP, Melo CA, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, Bussadori SK, Nunes FD, Mesquita-Ferrari RA. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci*. 2014 Mar;29(2):813-21. doi: 10.1007/s10103-013.
41. de Melo CA, Alves AN, Terena SM, Fernandes KP, Nunes FD, da Silva Dde F, Bussadori SK, Deana AM, Mesquita-Ferrari RA. Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle. *Lasers Med Sci*. 2016 Apr;31(3):531-8. doi: 10.1007/s10103-016-1888-9.
42. Ribeiro BG, Alves AN, Santos LADD, Fernandes KPS, Cantero TM, Gomes MT, França CM, de Fátima Teixeira da Silva D, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers Surg Med*. 2015 Sep;47(7):571-578. doi: 10.1002/lsm.22381.
43. 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.
44. Beasi WR, Toffoli LV, Pelosi GG, Gomes MVM, Verissimo LF, Stocco MR, Mantoni LC, Maia LP, Andraus RAC. Effects of photobiomodulation and swimming on gene expression in rats with the tibialis anterior muscle injury. *Lasers Med Sci* 2021 sep; 36 (7): 1379 – 1387.
45. Hai-Peng Lina, 1, Yan-Qing Zhengb, 1, Zhi-Ping Zhoua G-X, and Pingan Guoc. Ryanodine receptor antagonism alleviates skeletal muscle

- ischemia reperfusion injury by modulating TNF- α and IL-10. Clin Hemorheol Microcirc. 2018;1386-0291.
46. Macêdo Santiago L, Neto LGL, Borges Pereira G, Leite RD, Mostarda CT et al (2018) Effects of resistance training on immunoinflammatory response, TNF-alpha gene expression, and body composition in elderly women. J Aging Res 2018:1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/1467025>
47. LEAL-JUNIOR, E.C.P; VANIN, A.A; MIRANDA, E.F; CARVALHO, P.T.C; DALCORSO, S; BJORDAL, J.M. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emmitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. Lasers Med Sci. 2013.
48. Lee JE, Shah VK, Lee JE, Oh MS et al. Melittin—A bee venom component—Enhances muscle regeneration factors expression in a mouse model of skeletal muscle contusion. Journal of pharmacological sciences. 2019; 140(1):26-32.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Tobelem, Daysi da Cruz. "Avaliação dos efeitos da fotobiomodulação vascular no reparo neuromuscular e recuperação funcional após a lesão medular por compressão em ratos." (2022).

8. Anexo

8.1 Anexo A. 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 da fotobiomodulação associada ao exercício de resistência em meio aquático durante o processo de hipertrofia compensatória do músculo plantar em ratos Wistar", protocolada sob o CEUA nº 1664030522 (ID 000295), sob a responsabilidade de **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** e equipe; **VALERIA DE ARAUJO FERREIRA GREGIO DE SOUZA** - 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 25/05/2022.

We certify that the proposal "Effect of photobiomodulation associated with resistance exercise in aquatic environment during the process of compensatory hypertrophy of the plantar muscle in Wistar rats", utilizing 26 Heterogenics rats (26 males), protocol number CEUA 1664030522 (ID 000295), under the responsibility of **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** and team; **VALERIA DE ARAUJO FERREIRA GREGIO DE SOUZA** - 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 05/25/2022.

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

Vigência da Proposta: de **06/2022** a **12/2022** Área: **Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde**

| | | | | | | | |
|-----------|-------------------------------------|------|---------------|--------|----------------------|-------|--------------------|
| Origem: | Biotério - Unidade Vergueiro | sex: | Machos | idade: | 8 a 8 semanas | N: | 26 |
| Espécie: | Ratos heterogênicos | | | | | Peso: | 200 a 210 g |
| Linhagem: | Wistar | | | | | | |

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

São Paulo, 08 de junho de 2022

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Nove de Julho | Profa. Dra. Stella Regina Zamuner Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Nove de Julho |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

8.2 Anexo B. 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 3.1 3.9, 3.10 and 3.11 |
| 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. | 3.1 3.1 |
| 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). | Not reported |
| 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. | 3.12 3.12 |
| 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: a. What was done, how it was done and what was used. b. When and how often. c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures). | 3 3 3 3 |
| Results | 10 For each experiment conducted, including independent replications, report: 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. | 3.12 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 |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Abstract | 11 Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions. | Page 7 |
| Background | 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 1 |
| Objectives | 13 Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested. | 2 |
| Ethical statement | 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 |
| Housing and husbandry | 15 Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment. | 3.1 |
| Animal care and monitoring | 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 3.4 Not reported |
| Interpretation/scientific implications | 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 |
| Generalisability/translation | 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 |
| Protocol registration | 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 |
| Data access | 20 Provide a statement describing if and where study data are available. | Not reported |
| Declaration of interests | 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 |



Apêndice. Comprovante de submissão do artigo científico à Revista *Conscientiae Saúde*

#23401 Sinopse

RESUMO AVALIAÇÃO EDIÇÃO

Submissão

| | |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Autores | Carla Bernardo Soldera, Valéria Araújo-Gregio, Lucas Andreo, Tainá Caroline dos Santos Malavazzi, Fernanda Rocha Silva, Alessandro Melo Deana, Kristianne Porta Santos Fernandes, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari |
| Título | Fotobiomodulação com LED induz melhora na funcionalidade da marcha em ratos após lesão nervosa periférica |
| Documento original | 23401-104115-2-SM.DOCX 05/12/2022 |
| Docs. sup. | 23401-104123-1-SPDOCX 06/12/2022 INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR 23401-104124-1-SPJPG 06/12/2022 23401-104125-1-SPJPG 06/12/2022 23401-104126-1-SPJPG 06/12/2022 23401-104127-1-SPDOCX 06/12/2022 23401-104133-1-SPPDF 06/12/2022 |
| Submetido por | Raquel Agnelli Mesquita Ferrari  |
| Data de submissão | dezembro 6, 2022 - 11:47 |
| Seção | Artigos |
| Editor | Nenhum(a) designado(a) |
| Comentários do Autor | 5 de dezembro 2022 |