

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

ALINE SOUZA SILVA

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO VASCULAR NO TROFISMO MUSCULAR
E NA EXPRESSÃO DE MURF-1 E MIOSTATINA DURANTE A REGENERAÇÃO
MUSCULAR APÓS LESÃO AGUDA**

**São Paulo, SP
2024**

ALINE SOUZA SILVA

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO VASCULAR NO TROFISMO MUSCULAR
E NA EXPRESSÃO DE MURF-1 E MIOSTATINA DURANTE A REGENERAÇÃO
MUSCULAR APÓS LESÃO AGUDA**

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Reabilitação.

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

**São Paulo, SP
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Aline Souza.

Efeitos da fotobiomodulação vascular no trofismo muscular e na expressão de Murf-1 e miostatina durante a regeneração muscular após lesão aguda. / Aline Souza Silva. 2024.

48 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

Orientador (a): Profª. Drª. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Fotobiomodulação vascular. 2. Lesão muscular. 3. Fotobiomodulação. 4. Reparo muscular. 5. Fatores reguladores miogênicos.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita. II. Título.

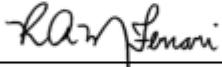
CDU 615.8

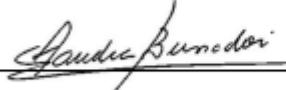
São Paulo, 16 de dezembro de 2024.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): **ALINE SOUZA SILVA**

Título da Dissertação: "EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO VASCULAR NO TROFISMO MUSCULAR
E NA EXPRESSÃO DE MURF-1 E MIOSTATINA DURANTE A REGENERAÇÃO MUSCULAR APÓS
LESÃO AGUDA"

Presidente: PROF(A). DR(A). RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI 

Membro: PROF(A). DR(A). SANDRA KALIL BUSSADORI 

Membro: PROF(A). DR(A). ANA CLAUDIA MUNIZ RENNO 

DEDICATORIA

À Deus, pela graça e sabedoria concedida que me guiaram em cada passo dessa jornada, iluminando e sustentando minha fé e renovando minha força a cada dia.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Ednaldo que são exemplos de amor, dedicação e perseverança. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada sacrifício silencioso e por sempre acreditarem em mim e me transmitirem com tanto amor, todos os valores e princípios que moldaram a pessoa que sou. Sou grata eternamente por tudo o que fizeram.

À minha irmã, Karine, minha confidente e amiga, cuja alegria e doçura iluminam os dias mais desafiadores e sempre esteve ao meu lado com palavras de conforto e gestos de apoio, compartilhando risadas que tornaram tudo mais leve, assim, fizeram toda a diferença nessa jornada. Você é um exemplo de amor incondicional no que faz e dedicação para conquistar todos os nossos sonhos.

Ao meu companheiro, Gabriel Willians, parceiro de tantas batalhas ao longo de todos esses anos, cujo amor e paciência foram um refúgio nos momentos de cansaço. Obrigada por sempre estar disposto a me ouvir, por cada gesto de cuidado, me incentivar, encorajar e enfim celebrar comigo cada vitória, me lembrando de que nenhum esforço é em vão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a tudo e todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui. Agradeço por todas as oportunidades que se apresentaram, pelos desafios que me fizeram crescer e pelas lições que aprendi ao longo do caminho. Cada experiência, cada pessoa e cada momento teve um papel fundamental em me fortalecer e me preparar para este momento.

*À minha orientadora, Professora **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**, que sua expertise, dedicação e visão foram essenciais para a construção deste trabalho e para além disso, seu acolhimento e incentivo com paciência e empatia, sempre com o olhar atento às minhas dificuldades e ao meu progresso. sou profundamente grata por toda confiança depositada em mim, pelo apoio constante longo de todo esse processo. O aprendizado que tive sob sua orientação vai muito além do acadêmico, e sou grata por tudo o que fez por mim.*

*À **Tainá Caroline dos Santos Malavazzi**, cujo seu apoio foi essencial para que eu chegasse até aqui. Desde o início acreditou em mim, e sua paciência, compreensão e disposição para me auxiliar em cada desafio ao longo dessa jornada fizeram toda a diferença. Sou profundamente grata por tudo o que fez por mim, por me proporcionar as condições para crescer, aprender e alcançar minhas conquistas. Todo o ensinamento compartilhado comigo, vão além do profissional. Deixo registrado toda a minha admiração.*

*Ao professor **Renato Araújo Prates**, por todo conhecimento, apoio e momentos de risada que tornaram os dias mais leves.*

*Agradeço à banca examinadora, Professora **Sandra Kalil Bussadori** e **Anna Claudia Muniz Renno**, pelo tempo dedicado e generosidade em compartilhar seus conhecimentos e experiências.*

*Aos colegas de laboratório que estiveram presentes, **Bruna, Rosani, Claudio e Alessandra, Ângela e Raquel**, por todo apoio, troca de experiência, discussão e risadas que fizeram diferença nessa jornada.*

*À estagiária, **Nathalia Cristina**, que sempre esteve disposta a me ajudar nos experimentos, com todo empenho, dedicação e vontade de aprender.*

*Às funcionárias e estagiárias do Biotério e área técnica, **Núbia, Nurya, Giuliane, Victória e Eduarda** por todo suporte e prontidão.*

*À **Universidade Nove de Julho - UNINOVE** pela estrutura e bolsa de estudos concedida, assim como a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado, possibilitando a minha permanência com dedicação exclusiva para a execução deste trabalho.*

Resumo

O músculo estriado esquelético desempenha funções essenciais, como a manutenção da postura e a movimentação do corpo humano. Devido à sua extensão e alta demanda, é especialmente suscetível a lesões, embora possua uma notável capacidade de regeneração. A fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado resultados positivos na regeneração muscular e isso tem garantido muito destaque por se tratar de um recurso não invasivo e com ausência de efeitos colaterais contudo a grande maioria dos estudos se refere a aplicação local da FBM (FBML). Mais recentemente, estudos com a fotobiomodulação vascular (FBMV) também descrevem os efeitos positivos sobre a regeneração muscular. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da FBMV sobre aspectos morfológicos e expressão de proteínas envolvidas no trofismo muscular durante o processo de regeneração após indução de lesão muscular aguda em modelo animal. Foram utilizados 65 ratos Wistar, divididos em quatro grupos experimentais (1- controle, 2- lesão, 3 -FBMV pré+lesão, 4- lesão+FBMV-pós). A FBMV foi aplicada com contato, de forma transcutâneo sobre a veia/artéria caudal dos animais utilizando os seguintes parâmetros (780nm; 40mW; 0,04 cm²; 80 J/cm²; 3,2J). Os músculos tibiais anteriores (TA) dos animais foram criolesionados bilateralmente com a aplicação de bastão resfriado em nitrogênio (10segundos/2X) e a eutanásia foi realizada nos períodos de análise de 1, 2, 5 e 7 dias. Os músculos TA foram coletados para análise de diâmetro e área de secção transversa das fibras musculares por meio das lâminas de H&E. A análise de expressão gênica de fatores como Miostatina e MuRF-1 foi realizada por qPCR. Todos os resultados foram submetidos à análise estatística (ANOVA/Tukey). Os resultados mostraram que, em relação ao diâmetro muscular e aos níveis de AST, o tratamento com FBMV pré-lesão apresentou redução no primeiro dia, enquanto os grupos Lesão e FBMV pós-lesão exibiram aumento significativo em relação ao controle. Nos dias dois e cinco, os grupos tratados com FBMV mostraram redução nos parâmetros em relação ao grupo Lesão. No sétimo dia, os valores nos grupos tratados aproximaram-se aos do controle, enquanto o grupo Lesão manteve redução persistente no diâmetro e aumento nos níveis de AST. Quanto à expressão de MuRF-1 e miostatina, o grupo lesão resultou em aumento significativo da expressão de ambas em 1, 2 e 5 dias em comparação aos grupos, controle, FBMV pré-lesão e FBMV pós-lesão. Após sete dias, os níveis de miostatina foram aumentados no grupo tratados previamente em relação ao grupo controle, lesão e FBMV pós-lesão, enquanto a expressão de MuRF-1 permaneceu elevada no grupo lesão. Em conclusão, a fotobiomodulação vascular (FBMV) demonstrou efeitos positivos na regeneração muscular, modulando parâmetros morfológicos e a expressão de proteínas como miostatina e MuRF-1. O tratamento pré-lesão mostrou impacto no sétimo dia mais significativo, enquanto a aplicação pós-lesão favoreceu a recuperação progressiva, reduzindo danos musculares e AST. Ambos os protocolos aproximaram os resultados aos níveis de controle no sétimo dia, destacando o potencial da FBMV como uma abordagem terapêutica não invasiva para lesões musculares.

Palavras-chave: Fotobiomodulação vascular, lesão muscular, Fotobiomodulação, reparo muscular, fatores reguladores miogênicos

Abstract

Skeletal striated muscle plays essential roles, such as maintaining posture and facilitating human body movement. Due to its size and high demand, it is particularly susceptible to injuries, although it possesses a remarkable capacity for regeneration. This process is complex and involves the expression of myogenic transcription factors at different stages. Photobiomodulation (PBM) has shown positive results in muscle regeneration, gaining attention as a non-invasive treatment with no reported side effects. Most studies focus on locally applied PBM (LPBM), proving effective when applied either before or after injury. More recently, vascular photobiomodulation (VPBM) has also shown promising effects in this context, leading to increased research interest. This study aims to evaluate the effects of VPBM, alone or combined with LPBM, on tissue morphology, muscle fiber phenotype determination, and the expression of myogenic factors and proteins involved in muscle trophism during the regeneration process after the induction of acute muscle injury in an animal model. A total of 105 Wistar rats were used, divided into six experimental groups: (1) control, (2) injury, (3) VPBM pre-injury, and (4) post-injury + VPBM. VPBM was applied transcutaneously and pointwise over the animals' caudal artery/vein. using the following parameters for both treatments (780 nm; 40 mW; 0.04 cm²; 80 J/cm²; 3.2 J). The anterior tibial (AT) muscles of the animals were cryolesioned bilaterally by applying a nitrogen-cooled rod (10 seconds/2X), and euthanasia was performed at 1, 2, 5, and 7 days post-injury. AT muscles were collected for diameter and cross-sectional area analysis of muscle fibers through H&E-stained slides. Gene expression analysis of factors such as Myostatin, and MuRF-1 was performed by qPCR. The data were submitted to statistical analysis (ANOVA/Tukey). The results showed that after 1 day, the pre-injury FBMV treatment showed a decrease while the Lesion and post-injury FBMV groups exhibited an increase in comparison to the control group. At 2 and 5 days, the treated groups showed a reduction in diameter compared to the Lesion group. By day 7, the treated groups reached values similar to the control, while the Lesion group showed a reduction. Regarding AST, on day 1, the pre-injury FBMV treatment showed a decrease , while the Lesion and post-injury FBMV groups exhibited an increase. On day 2, no significant differences were observed between the groups. After 5 days, the Lesion and post-injury FBMV groups showed a significant increase, whereas the preventive treatment maintained values close to the control. By day 7, the FBMV-treated groups displayed AST values higher than the Lesion group but close to the control. With respect to the expression of MuRF-1 and myostatin, the injury group exhibited a significant upregulation of both proteins at 1, 2, and 5 days compared to the control, pre-injury FBMV, and post-injury FBMV groups. At seven days, myostatin levels remained elevated in the pre-treatment group compared to the control, injury, and post-injury FBMV groups, whereas MuRF-1 expression remained consistently elevated in the injury group. In conclusion, vascular photobiomodulation (FBMV) demonstrated beneficial effects on muscle regeneration by modulating morphological parameters and the expression of key proteins such as myostatin and MuRF-1. The pre-injury treatment exhibited a more pronounced impact at seven days, whereas post-injury application facilitated progressive recovery, mitigating muscle damage and reducing AST levels. Both treatment protocols effectively approximated the outcomes to control levels by the seventh day, underscoring the potential of FBMV as a non-invasive therapeutic strategy for muscle injuries.

Key-words: Vascular photobiomodulation, muscle injury, photobiomodulation, muscle repair, myogenic regulatory factors

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Fluxograma do procedimento experimental	22
Figura 2. Linha do tempo do procedimento experimental.....	23
Figura 3. Análise da AST no utilizando o Software ImageJ (NIH)	27
Figura 4. Avaliação morfológica dos cortes histológicos por eosina e hematoxilina (H&E). Imagens representativas de cada grupo e período experimental (magnificação: 100x). FBMV, fotobiomodulação vascular.	31
Figura 5. Análise quantitativa do diâmetro (μ m) das fibras musculares avaliados nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular. * P <0,05 vs Controle. # p <0,05 vs Lesão. \$ P <0,05 vs FBMV pré + Lesão.	33
Figura 6. Análise da Área de Secção Transversa (μ m) das fibras musculares nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular. * P <0,05 vs Controle. # p <0,05 vs Lesão. \$ P <0,05 vs FBMV pré + Lesão.	34
Figura 7. Expressão gênica de Miostatina normalizada pela expressão do grupo Lesão e avaliada nos grupos Controle, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular* p <0,05 vs Controle, # p <0,05 vs Lesão, \$ p <0,05 vs FBMV pré + Lesão.	35
Figura 8. Expressão gênica de MuRF-1 normalizada pela expressão do grupo Lesão e avaliada nos grupos Controle, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular * p <0,05 vs Controle, # p <0,05 vs Lesão.....	36

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos da FBMV	23
Tabela 2. Condições da reação e programa de qPCR	27
Tabela 3. Primers utilizados para a análise de expressão gênica.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlGaAs	Arseneto de gálio e alumínio
AST	Área de Secção Transversa
ATP	Adenosina Tri-fosfato
Ca+	Cálcio
Cm ²	Centímetro quadrado
CPM	Cadeia Pesada de Miosina
CS	Células Satélites
FRM	Fator Regulatório Miogênico
FBM	Fotobiomodulação
FBML	Fotobiomodulação Local
FBMV	Fotobiomodulação Vascular
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
mL	mililitro
mm	milímetro
MuRF-1	Muscle Ring Finger-1
mW	miliwatts
mW/cm ²	milliwatt por centímetro quadrado

nm	nanômetros
s	segundos
TA	Tibial Anterior
µL	microlitros
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	13
2. OBJETIVO	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3. METODOLOGIA	20
3.1 Desenho do estudo e aspectos éticos (ADD)	20
3.2 Local	20
3.3 Delineamento experimental	20
3.4 Procedimentos	24
3.4.1 Procedimento de Criolesão	24
3.4.2 Fotobiomodulação Vascular (FBMV)	24
3.4.3 Eutanásia dos Animais e Remoção dos Músculos	26
3.5 Análise Qualitativa e Quantitativa das Fibras Musculares	26
3.6 Análise por PCR em Tempo Real	27
3.6.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)	28
3.6.2 qPCR	29
3.7 Análise estatística	30
4. RESULTADOS	30
4.1 Análises morfológicas qualitativas das fibras musculares por HE	30
4.2 Análise morfológicas quantitativas relativa ao trofismo das fibras musculares por HE	32

4.2.1 Diâmetro.....	32
4.2.2 Área de Secção Transversa	33
4.3 Análise de expressão gênica de Miostatina e MURF-1 por qPCR	34
4.3.1 Expressão de Miostatina	34
4.3.2 Expressão gênica de MuRF-1	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
7 REFERÊNCIAS	42
7. ANEXOS.....	45
7.1 ANEXO 1. Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA.....	45
7.2 ANEXO 2. Publicação em co-autoria.....	46
7.3 ANEXO 3. Trabalhos apresentados no Fórum Internacional de Biofotônica (FIB) (2024)	47
7.4 ANEXO 4. Trabalho apresentado no I ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE INVESTIGACIÓN Y PRÁCTICA EN BIOFOTÓNICA (2024).....	48

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O sistema musculoesquelético é uma estrutura complexa e importante composta por músculos, ligamentos, cartilagens, nervos e tecido conjuntivo. Essas estruturas desempenham um papel crucial na função motora, equilíbrio, postura e proteção (1). Dada a sua extensão, representa o tecido mais abundante em nosso corpo, desempenhando um papel essencial na realização de movimentos por meio de contrações, bem como exerce funções contráteis nos órgãos internos (2).

Existem três tipos distintos de músculos: o músculo liso, o estriado cardíaco e o estriado esquelético. O músculo estriado esquelético possui a função de gerar força e movimento rápido por meio de contração das fibras musculares, que envolve a utilização de energia química armazenada na forma da molécula de alta energia adenosina tri-fosfato (ATP) e o estímulo (potencial de ação) gerado por neurônios motores (3,4). As fibras musculares são compostas por inúmeras células multinucleadas, envoltas pelo endomísio, uma fina membrana de tecido conjuntivo e um tecido mais denso denominado de perimísio, formando um fascículo de fibras com cada camada envolta pela matriz extracelular. O conjunto dos fascículos finalmente reúnem e formam estruturalmente o músculo estriado esquelético sendo este envolvido também por tecido conjuntivo denominado epimísio (4,5).

O tecido muscular apresenta alta capacidade de regeneração devido a presença de células precursoras miogênicas, as células satélites musculares (CS), dispostas entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular normalmente em estado quiescente e ativadas em resposta a lesão. Ao serem ativadas, as CS prontamente proliferam e diferenciam em mioblastos para reparar a área lesionada ou até a formação de novas fibras musculares (6,7).

As fibras musculares podem ser classificadas em diferentes fenótipos de acordo com a predominância determinada pela via metabólica de obtenção de energia. As fibras do tipo I (contração lenta) são altamente vascularizadas e resistente à fadiga, promovem força de contração suficiente por períodos de longa duração, utilizando o metabolismo predominantemente oxidativo como fonte de energia (2,4). Em contraste, as fibras do tipo II promovem força de contração rápida e são subdivididas entre tipo IIa, sendo uma fibra intermediaria, rápida e resistente à fadiga e utiliza o metabolismo oxidativo-glicolítico e a fibra do tipo IIb,

caracterizada como uma fibra rápida com baixa resistência a fadiga e, exibe altos níveis de força muscular e, portanto, utiliza o metabolismo glicolítico para obtenção de energia(2,4,8).

Algumas proteínas ganham destaque e desempenham importantes funções no músculo esquelético incluindo a miostatina e MuRF-1 (Muscle RING Finger-1) são proteínas-chave envolvidas na regulação do trofismo muscular, desempenhando papéis distintos na regeneração muscular.

A miostatina, é uma proteína da família TGF-β (transforming growth factor beta) e atua como um regulador negativo do crescimento muscular (9). Ela inibe a proliferação e a diferenciação de células satélites, fundamentais para a regeneração muscular, sendo responsável por regular negativamente o crescimento muscular. Devido a seu papel inibitório sobre o processo de diferenciação das células musculares, desfavorece o processo de hipertrofia, ou seja, sua expressão exerce efeitos anti-anabólicos (9,10).

Após uma lesão muscular, os níveis de miostatina tendem a aumentar inicialmente, limitando o crescimento muscular como parte do equilíbrio homeostático. Contudo, sua redução subsequente é essencial para permitir a regeneração eficiente, promovendo a formação de novas fibras musculares. (11)

MuRF-1 é uma proteína ligase ubiquitina E3, crucial no sistema ubiquitina-proteassoma, responsável pela degradação de proteínas musculares danificadas ou desnecessárias sendo um importante sinalizador da atrofia muscular.(12)

Durante os estágios iniciais da regeneração, MuRF-1 é altamente expressa para eliminar proteínas comprometidas devido ao dano muscular. Com o avanço do processo regenerativo, sua expressão diminui, permitindo a síntese proteica e a recuperação do tecido muscular(13).

Considerando o importante papel destas proteínas no trofismo muscular, níveis elevados e sustentados de miostatina ou MuRF-1 podem atrasar a regeneração muscular, levando à atrofia e a uma recuperação inadequada (9,14,15).

A modulação dessas proteínas pode acelerar o processo regenerativo, promovendo um melhor equilíbrio entre degradação e síntese proteica. Estudos têm explorado a inibição da miostatina e a regulação de MuRF-1 como potenciais estratégias terapêuticas para melhorar a regeneração muscular em condições de

lesões agudas, doenças musculoesqueléticas ou mesmo em casos de sarcopenia (16–19)

A miostatina e a MuRF-1 também desempenham papéis importantes na regulação do tipo de fibra muscular, influenciando a composição e a funcionalidade do tecido muscular durante o processo de regeneração. A miostatina tende a favorecer fibras do tipo I (oxidativas, de contração lenta) ao inibir o crescimento muscular e a diferenciação em fibras do tipo II (glicolíticas, de contração rápida)(20).

Após uma lesão, a redução nos níveis de miostatina pode favorecer a formação de fibras do tipo II, que são mais susceptíveis a regeneração rápida e maior capacidade contrátil, embora mais propensas à fadiga. Esse equilíbrio é crítico para a recuperação funcional do músculo.(21,22)

O *Muscle Ring Finger-1* (*MuRF-1*) é uma proteína presente nos três tipos de músculos, com maior predominância no músculo esquelético. Está diretamente associada à atrofia muscular, sendo considerada uma reguladora chave em comparação com outras isoformas (23). *MuRF-1* está envolvida na degradação de proteínas específicas associadas a fibras musculares do tipo II. Durante períodos de atrofia ou regeneração, níveis elevados de *MuRF-1* podem levar à redução preferencial de fibras do tipo II, promovendo um perfil mais oxidativo (tipo I) (23,24)

Durante o processo regenerativo, a regulação de *MuRF-1* é essencial para evitar a perda desproporcional de fibras do tipo II, garantindo a recuperação equilibrada do tecido muscular. Assim a proporção entre fibras do tipo I e II pode ser influenciada pela expressão dessas proteínas, especialmente em condições de lesão ou atrofia. Em condições de homeostase, a expressão de *MuRF-1* é baixa, mas aumenta significativamente em resposta a estressores que induzem a atrofia, como a sinalização de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo e glicocorticoides (25–27).

Apesar da alta capacidade de regeneração do tecido musculoesquelético, em algumas situações, a regeneração completa pode não ocorrer, dependendo do tipo e extensão da lesão. Isso pode levar à formação de tecido cicatricial, resultando em fibrose muscular e comprometimento funcional (28)

No contexto do reparo muscular, a fotobiomodulação (FBM) tem sido amplamente estudada devido ao seu potencial para acelerar a regeneração de tecidos danificados e reduzir a inflamação. A FBM é uma terapia baseada no uso

de luz não ionizantes, incluindo lasers e LEDs, geralmente na faixa visível e infra vermelho próximo, para estimular processos biológicos e promover a regeneração celular e tecidual. A luz aplicada penetra nos tecidos, sendo absorvida por cromóforos celulares, como a citocromo c oxidase nas mitocôndrias, o que leva ao aumento da produção de ATP, modulação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e liberação de fatores de sinalização celular (29,30)

Os resultados positivos advindos do emprego da FBM estão intrinsecamente associados às características do Laser em baixa intensidade (LBI), tais como sua monocromaticidade e estreita região espectral, o que assegura um controle mais eficaz da quantidade de energia entregue ao tecido. Destaca-se a segurança terapêutica inerente ao método, uma vez que este é não invasivo, de fácil aplicação e com menor possibilidade de riscos (31,32). A fotobiomodulação local (FBML) tem apresentado efeitos significativamente positivos em modelos experimentais e clínicos, demonstrando sua capacidade de induzir respostas teciduais, especialmente ao utilizar comprimentos de onda vermelho e infravermelho (28,33,34). Essa abordagem possui um potencial significativo na modulação do reparo tecidual (33), promoção de analgesia(35), modulação da resposta inflamatória (36), redução do edema (37) e remodelação da matriz extracelular (MEC) por meio da síntese e organização das fibras de colágeno (31,38).

A FBML também demonstrado na literatura efeitos positivos quando aplicada antes do acometimento ou indução de lesões musculares, ou seja, de forma preventiva. Adabbo et al (2016) (34), em modelo animal de aplicação prévia da FBML e indução da criolesão do músculo TA e exercício aeróbio observaram que essa forma de irradiação induziu melhor recuperação muscular, apontando como principal justificativa a capacidade de induzir a angiogênese, garantindo uma melhor vascularização da região lesionada e melhora da oxigenação tecidual, e com efeitos analgésicos e anti-inflamatórios.

Adicionalmente, a FBML tem se mostrado promissora no processo de regeneração de lesões musculares, acelerando o reparo muscular e preservando a função das fibras musculares, devido à sua capacidade de modular mediadores pró-inflamatórios (35). De Lima et al. (2018) relataram que a aplicação da FBML, tanto antes quanto após a lesão, resultou em efeitos mais expressivos na modulação de CPM, calcineurina e miostatina na fase final do reparo muscular (16).

Com relação à aplicação do LBI em tecidos biológicos, já se sabe que sua aplicação local direta na lesão gera benefícios terapêuticos (39–41). Entre os métodos de aplicação, destaca-se a forma vascular não-invasiva (FBMV), que envolve a irradiação transcutânea ou sublingual, derivada da irradiação intravascular (ILIB, Intravascular Laser Irradiation of Blood). Embora a literatura ainda seja limitada, estudos clínicos e experimentais têm mostrado resultados promissores, como analgesia, melhora da circulação sanguínea, redução da inflamação, modulação do sistema imunológico e benefícios para desordens musculoesqueléticas e doenças sistêmicas(32,38,42).

A FBML apresenta efeitos positivos já estabelecidos na literatura quando aplicada antes de uma lesão, contribuindo para o reparo muscular (16,33,34,43). Neste contexto, a FBMV também se mostra promissora, devido à sua ação sistêmica e resultados positivos em modelos experimentais de lesão medular (44), hipertrofia muscular compensatória (45) e lesão muscular aguda, com efeitos mais pronunciados quando aplicada previamente (42).

Estudos experimentais indicam benefícios da FBMV no reparo muscular. Lopez et al. (2021) (42) justificaram as limitações da aplicação local da FBML, como o tempo necessário e a dificuldade de prever os locais a serem irradiados. Aplicando a FBMV de forma transcutânea sobre a veia/artéria caudal de ratos Wistar com criolesão no músculo tibial anterior, observaram uma modulação de marcadores bioquímicos relacionados à lesão muscular, com efeitos mais pronunciados quando a FBMV foi aplicada antes da lesão. A técnica também reduziu a mionecrose e o infiltrado inflamatório, além de aumentar a neovascularização, sugerindo que a aplicação sistêmica da FBMV influencia positivamente o reparo muscular, modulando funções químicas e fisiológicas.

O estudo recente de Malavazzi et al. (2024) (46) demonstrou que a aplicação preventiva de FBMV promoveu efeitos significativos nos parâmetros séricos hematológicos e leucocitários, além de aspectos histológicos do remodelamento tecidual. A FBMV, tanto preventiva quanto terapêutica, foi capaz de modular marcadores inflamatórios, favorecendo o processo de reparo muscular.

Martinelli et al. (2022) (45) compararam o uso da FBML (780 nm, 40 mW, 0,04 cm², 0,4 J, 80 s) e da FBMV (780 nm, 40 mW, 0,04 cm², 3,2 J, 80 s), observando que a aplicação vascular aumentou o diâmetro e a área de secção

transversal das fibras musculares durante a hipertrofia muscular compensatória em modelo animal, melhorando a adaptação do músculo às demandas funcionais.

Tobelem et al. (2023)(44) publicaram recentemente um estudo sobre a influência da FBMV (780 nm, 40 mW, 0,04 cm², 3,2 J, 80 s) na recuperação motora de ratos com lesão medular, mostrando que a aplicação precoce (2 horas após a lesão) favoreceu a recuperação funcional e morfológica do músculo e da estrutura neural, reduzindo a área da lesão.

Ramos et al. (2018) (47) observaram os efeitos positivos da FBMV (660 nm, 0,1 mW, 0,028 cm², 90 J/cm², 900 s) em um modelo *in vivo* de lesão cutânea, melhorando a qualidade e deposição de fibras colágenas. Além disso, estudos que utilizaram LED (850 nm, 30 mW, 3,2 J) aplicados sobre a veia/artéria caudal em modelo de criolesão muscular demonstraram redução da inflamação, aumento de fibras musculares imaturas, redução da atividade de MMP-2 e aumento das fibras colágenas durante o reparo muscular após lesão aguda(39).

Assim, o estabelecimento de protocolos com a Fotobiomodulação Local (FBML) e a Fotobiomodulação Vascular (FBMV) para a prevenção e tratamento de lesões musculares tem se mostrado promissor. Essas técnicas oferecem uma solução não invasiva, com menor impacto sistêmico em comparação a medicamentos, além de poderem ser utilizadas como terapias complementares. Com seus diversos benefícios, essas intervenções são particularmente vantajosas na recuperação de quedas, cirurgias em idosos, no manejo de doenças musculoesqueléticas e, especialmente, para atletas, que apresentam maior risco de lesões musculares.

Portanto, explorar a aplicação da FBMV na modulação de proteínas chave envolvidas no trofismo muscular, bem como na recuperação direcionada ao perfil de fibras musculares, pode contribuir significativamente para avanços em estratégias terapêuticas personalizadas, com benefícios clínicos amplos e potencial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar o efeito da FBMV sobre os aspectos morfológicos e expressão de proteínas envolvidas no trofismo muscular durante o processo de regeneração após a indução de lesão muscular aguda em modelo animal.

2.2 Específicos

Avaliar o efeito da FBMV, sobre:

- ✓ Os aspectos morfológicos de diâmetro e área de secção transversa das fibras musculares do m. tibial anterior em processo de regeneração após lesão aguda em cortes histológicos corados com H&E.
- ✓ A expressão gênica de fatores envolvidos no trofismo muscular (miostatina e MuRF-1) por qPCR.

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo e aspectos éticos (ADD)

Este estudo experimental foi conduzido no laboratório de pesquisa do Programa de Mestrado e Doutorado em Medicina – Biofotônica, localizado na Unidade Vergueiro (3º Andar Subterrâneo) da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). Este estudo foi conduzido de acordo com as normas do National Animal Experimentation Control Council (CONCEA). Todas as medidas apropriadas foram tomadas para minimizar a dor, o desconforto e o estresse nos animais. Este estudo só foi iniciado após aprovação do Animal Use Ethics Committee (CEUA) sob o número de protocolo 1273010623 (ANEXO 1).

3.2 Local

Os experimentos foram realizados no laboratório de pesquisa do PPG em Biofotônica Aplicada a Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) no campus Vergueiro.

3.3 Delineamento experimental

Foram utilizados 65 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, *Mammalia*), com doze semanas de vida, 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 1 – Controle: Os animais não irradiados e não lesionados (n=5);
- ✓ Grupo 2 – Lesão sem tratamento: Os animais foram lesionados no músculo tibial anterior (TA) e submetidos a posicionamento do equipamento laser desligado (n=20);

- ✓ Grupo 3 – FBMV prévia + Lesão: submetidos à FBMV prévia (com os mesmos parâmetros dosimétricos) 24 horas antes da criolesão do músculo TA (n=20);
- ✓ Grupo 4 – Lesão + FBMV pós: lesionados no músculo TA e submetidos após 2h à FBMV (com os mesmos parâmetros dosimétricos) (n=20).

Os animais dos grupos 2, 3 e 4 foram eutanasiados após 1, 2, 5 e 7 dias após a lesão, sendo 5 animais de cada grupo por período. Os animais do grupo controle (1) foram eutanasiados sem distinção de período experimental.

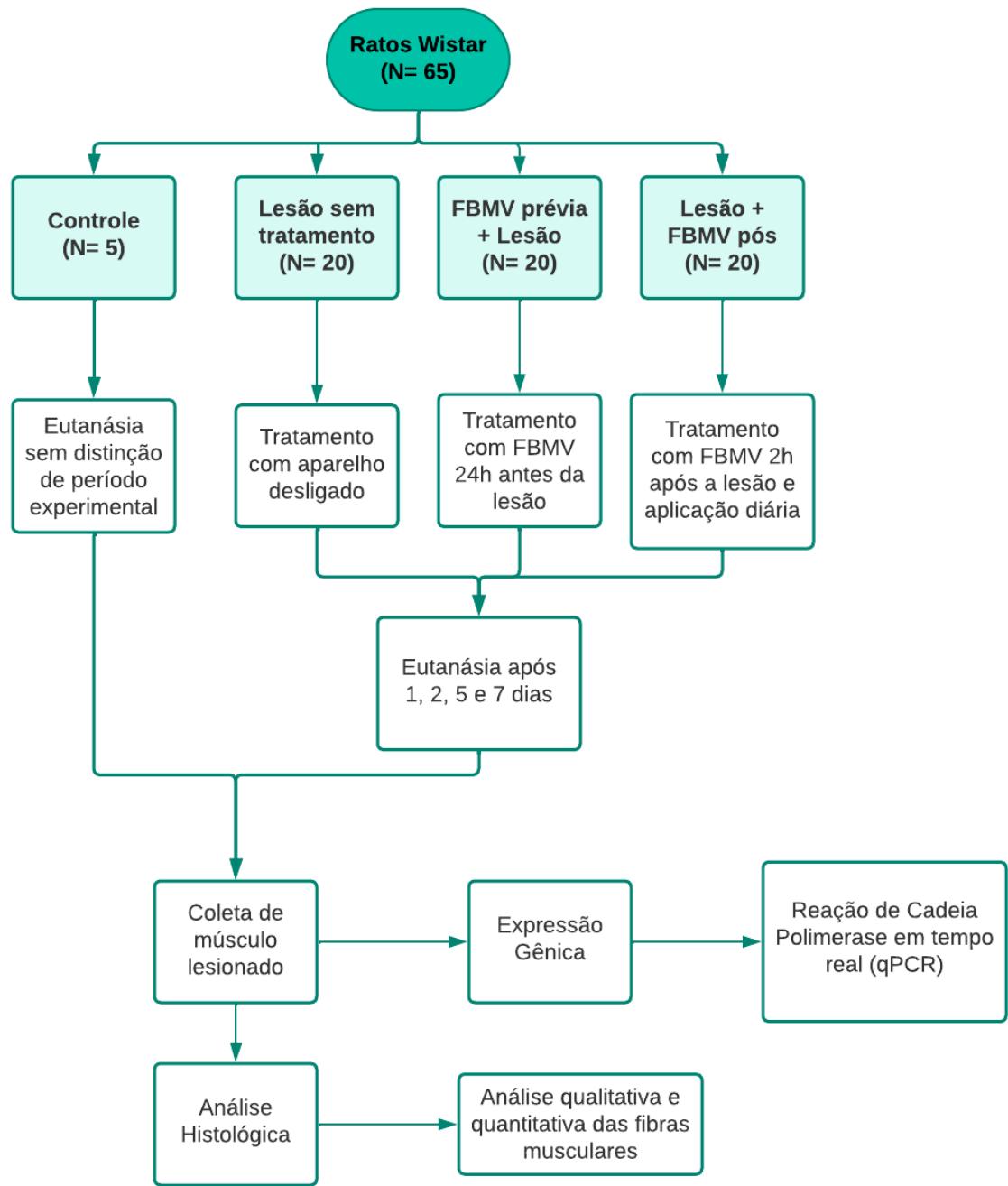


Figura 1 Fluxograma do procedimento experimental

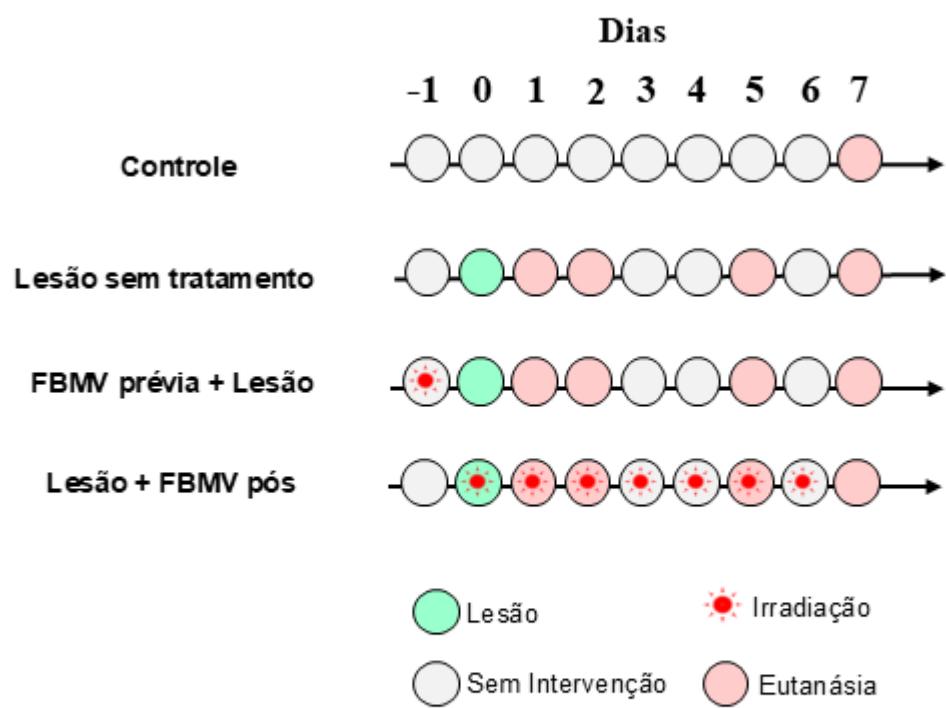


Figura 2. Linha do tempo do procedimento experimental.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Procedimento de Criolesão

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme descrito na literatura (19,22,35–37). Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com administração intraperitoneal de 1 mL/kg de 1% ketamina HCL (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 2% xilazina (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Para aplicação da anestesia foram utilizadas seringas com agulhas ultrafinas (modelo insulina, BD, Juiz de Fora, MG, Brasil). Posteriormente à indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana e foi realizada a assepsia e tricotomia da área a ser operada.

O músculo tibial anterior (TA), de ambas as patas posteriores, foi exposto cirurgicamente e submetido ao procedimento de criolesão. Este procedimento consiste em resfriar a extremidade de uma haste metálica plana (3 mm de diâmetro), em nitrogênio líquido durante o período de 30 segundos e aplicá-la por duas vezes na superfície ventral do músculo exposto, cada aplicação com 10 segundos de duração. Após este procedimento foi realizada a sutura na área da incisão com fio de poliamida (5.0).

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

Com o objetivo de diminuir a sensibilidade dolorosa pós-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.

3.4.2 Fotobiomodulação Vascular (FBMV)

Foi utilizado um laser de diodo de Arseneto de gálio e alumínio (AlGaAs) Twin-laser® (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil). A irradiação da FBMV foi realizada em modo pontual, sobre um único ponto, e em contato com a veia/artéria na cauda dos animais. em angulação de 90 graus com a ponteira do equipamento de laser em contato com o tecido utilizando os parâmetros descritos na tabela 2.

Tabela 1 Parâmetros dosimétricos da FBMV

<i>Características</i>	<i>FBMV</i>
Comprimento de onda [nm]	780
Modo de Funcionamento	contínuo
Potência [mW]	40
Diâmetro de abertura [cm]	0,23
Irradiância na abertura [mW/cm ²]	1000
Área do feixe [cm ²]	0,04
Tempo de exposição [s]	80
Exposição Radiante [J/cm ²]	80
Número de pontos irradiados	1
Energia por ponto [J]	3,2
Energia total irradiada [J]	3,2
Técnica de aplicação	contato direto

A irradiação seguiu os parâmetros dosimétricos descritos por Lopez et al. (2022) (42) e Malavazzi et al. (2024) (46). Foi realizada uma aplicação perpendicular, em um ângulo de 90º em relação ao emissor e à pele do animal, para evitar a refração do feixe de laser. A FBMV foi aplicada 24 horas antes da lesão no grupo FBMV prévia + lesão, ou 2 horas após a lesão nos grupos lesão + FBMV e lesão sem tratamento. A irradiação foi realizada a cada 24 horas para os animais do grupo sem lesão + FBMV. O tratamento teve intervalos de 24 horas, totalizando 1, 2, 5 e 7 sessões para os grupos avaliados nos tempos experimentais de 1, 2, 5 e 7 dias, até o momento da eutanásia de cada grupo experimental. A

potência de emissão do laser foi verificada usando o "Laser Check power meter" (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil) no início e no final do procedimento experimental.

3.4.3 Eutanásia dos Animais e Remoção dos Músculos

Os animais foram eutanasiados após cada período experimental (1, 2, 5 e 7 dias), utilizando uma superdose de anestésico. Para a remoção do músculo TA, foi realizada assepsia, tricotomia e incisão para exposição e remoção total do tecido muscular. Os músculos TA de ambas as patas foram coletados (D – análise e E – exp. G) e seccionados ao meio, sendo mantidos sob refrigeração (-80º C) para posterior avaliação da expressão gênica.

3.5 Análise Qualitativa e Quantitativa das Fibras Musculares

As amostras musculares foram fixadas em solução de formaldeído, desidratadas com álcoois, e fixadas com xanol (Reagen) e parafina (Paraplast, Sigma). Em seguida, cortes de 10 µm de espessura foram obtidos com um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As amostras foram examinadas em microscópio de luz (Axioplan 2, Zeiss, Alemanha) para determinar a área de secção transversa (CSA) e o diâmetro das fibras musculares. Os campos foram fotografados em microscópio de luz convencional (Axioplan 2, Zeiss, Alemanha) com aumento de 400X. As imagens foram analisadas no programa ImageJ (National Institute of Health - NIH, EUA). Foram analisadas cinco áreas por lâmina padronizado em quadrante superior, inferior, lateral direita e esquerda de cinco animais por grupo, com um total de 100 fibras por área para as análises de CSA e diâmetro.

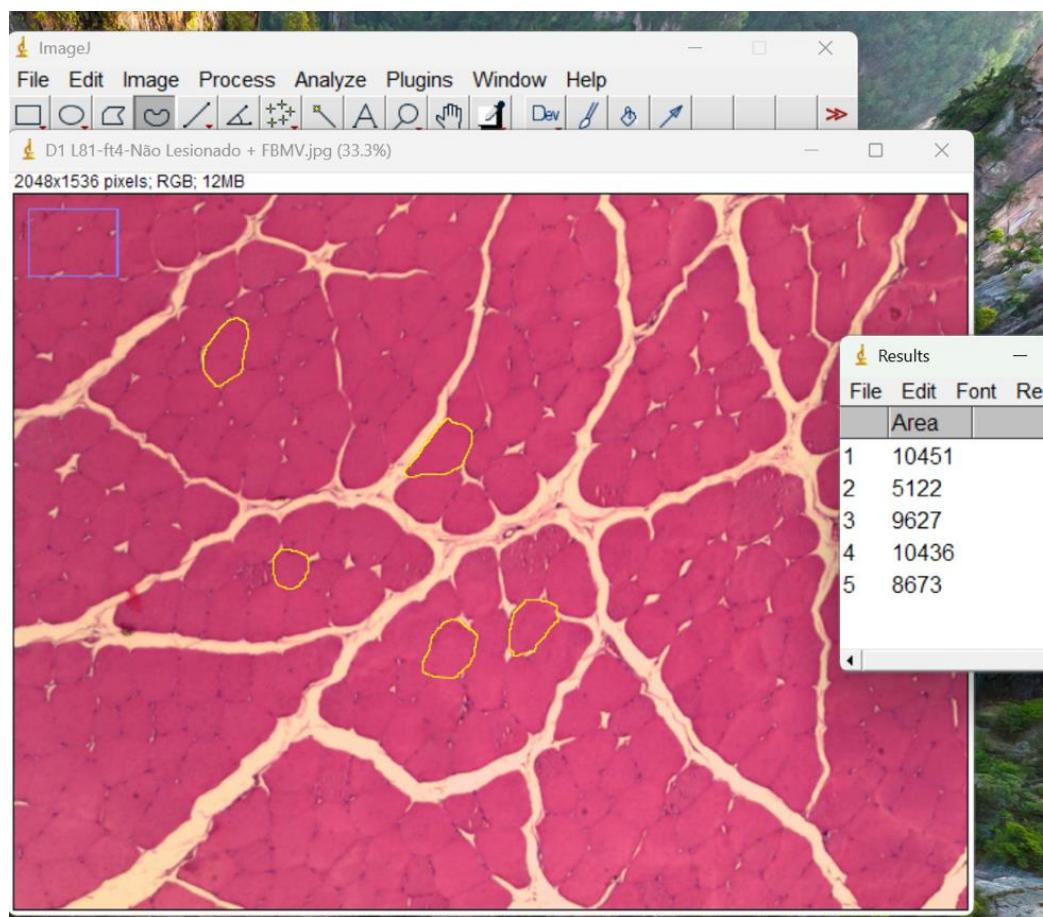


Figura 3. Análise da AST no utilizando o Software ImageJ (NIH)

3.6 Análise por PCR em Tempo Real

O tecido muscular extraído foi inicialmente macerado em nitrogênio líquido, utilizando-se uma amostra do músculo tibial anterior pesando entre 80 e 100 mg. Posteriormente, o material foi homogeneizado em 1 mL de reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil) para isolamento do RNA total. Após a lise celular, 300 μ L de clorofórmio gelado foram adicionados, seguidos de incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. O material foi então centrifugado a 10.200 rpm por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante contendo o RNA total foi cuidadosamente transferido para um novo microtubo. Para precipitação do RNA, 750 μ L de álcool isopropílico gelado foram adicionados, com incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, seguida de centrifugação a 10.200 rpm por 10 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e 1 mL de álcool 75% gelado foi adicionado ao precipitado de RNA total. A amostra foi então centrifugada a 8.400 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o álcool foi cuidadosamente descartado, e o RNA total foi ressuspensido em 20 µL de água livre de RNase. As amostras foram armazenadas a -80°C.

A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio, enquanto sua quantificação foi realizada no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) com medições nas absorbâncias de 260 e 280 nm. Para evitar contaminação por DNA genômico, todas as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen).

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC, e todo o material plástico e as vidrarias foram previamente tratados para prevenir contaminação por RNase.

3.6.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) para obtenção do cDNA. Em um tubo de 0,5 ml, foram adicionados 1 µl de RNA total, 1 µl de DNase I, 1 µl de tampão 10x do kit "DNase I Amplification Grade" (Invitrogen) e água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC, completando o volume total de 10 µl. Os reagentes foram misturados e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 µl de EDTA (25 nM) e a mistura foi aquecida em termociclador (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) por 10 minutos a 65°C para inativar a atividade da DNase.

Para a obtenção do cDNA foi preparado um mix para cada reação contendo: 2 µl de tampão RT 10x, 0,8 µl de dNTP Mix 25X (100 nM), 2 µl de Random Primers 10x RT, 1 µl de RNase Out (Invitrogen), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e água livre de RNase para um volume final de 10 µl. O mix foi adicionado a cada tubo, misturado adequadamente e incubado em termociclador (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems), submetido às seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

3.6.2 qPCR

Para a análise de expressão gênica, três amostras de cada grupo foram analisadas em duplicata para todos os genes. As reações foram realizadas utilizando oligonucleotídeos iniciadores ("primers forward e reverse") específicos para as proteínas Miostatina e MuRF1 para ratos. O gene constitutivo utilizado como controle foi o GAPDH. Além do cDNA das amostras, foi utilizado o SYBR Green Master Mix (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), e as placas foram processadas no equipamento QuantStudio 1 Real-Time PCR System. A quantificação foi realizada utilizando o método $2 - \Delta\Delta CT$ (Livak et al., 2001), utilizando o grupo controle como amostra referência.

Tabela 2 Condições da reação e programa de qPCR

	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
40	Desnaturação Inicial	95	4 min
		95	10 s
	1	60	30 s
	1	95	15 s
	1	60	1 h
	1	95	
			15 min

Tabela 3. Primers utilizados

Gene	GenBank Access	Primers 5' → 3'
<i>MuRF-1</i>	NM_080903.1	F: TGTCTGGAGGTCGTTCCG R: ATGCCGGTCCATGATCACTT
<i>Miostatina</i>	NM_005259.2	F: CTACCACGGAAACAATCATTA R: AGAACACATTGGGCTTTCCAT
<i>GAPDH</i>	NM_017008.4	F: GCATCCTGGGCTACACTGA R: CCACCACCTGTTGCTGTA

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Software GraphPad Prism 9.3.0 (San Diego, CA, USA). O teste de normalidade Shapiro Wilk foi utilizado para determinação da distribuição de dados. Para os dados paramétricos e normalizados foram expressos em média e erro padrão e foram analisados estatisticamente utilizando o teste One Way (ANOVA) seguido do teste post hoc de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análises morfológicas qualitativas das fibras musculares por HE

A figura 4 exibe imagens representativas dos aspectos morfológicos de cada grupo experimental nos períodos de 1, 2, 5 e 7 dias. O grupo controle apresentou morfologia preservada, sem sinais de lesão ou presença de células inflamatórias, com fibras musculares poligonais, múltiplos núcleos periféricos e discreta vascularização como esperado. O grupo lesão apresentou fibras musculares poligonais com morfologia periférica irregular, presença de lesão e células inflamatórias em todos os tempos experimentais, além de edema intersticial moderado nos dias 2 e 5. Os aspectos morfológicos do grupo com tratamento prévio ressaltam a presença de lesão e células inflamatórias em todos os tempos experimentais em maior quantidade em 2 dias, apresenta fibras musculares poligonais e áreas com fibras periféricas irregulares, presença de edema intersticial moderado nos dias 1, 2 e 5. O grupo com tratamento pós lesão apresentou morfologia poligonal, presença de células inflamatórias em todos os períodos e evidenciou edema intersticial especialmente nos dias 1, 2 e 5.

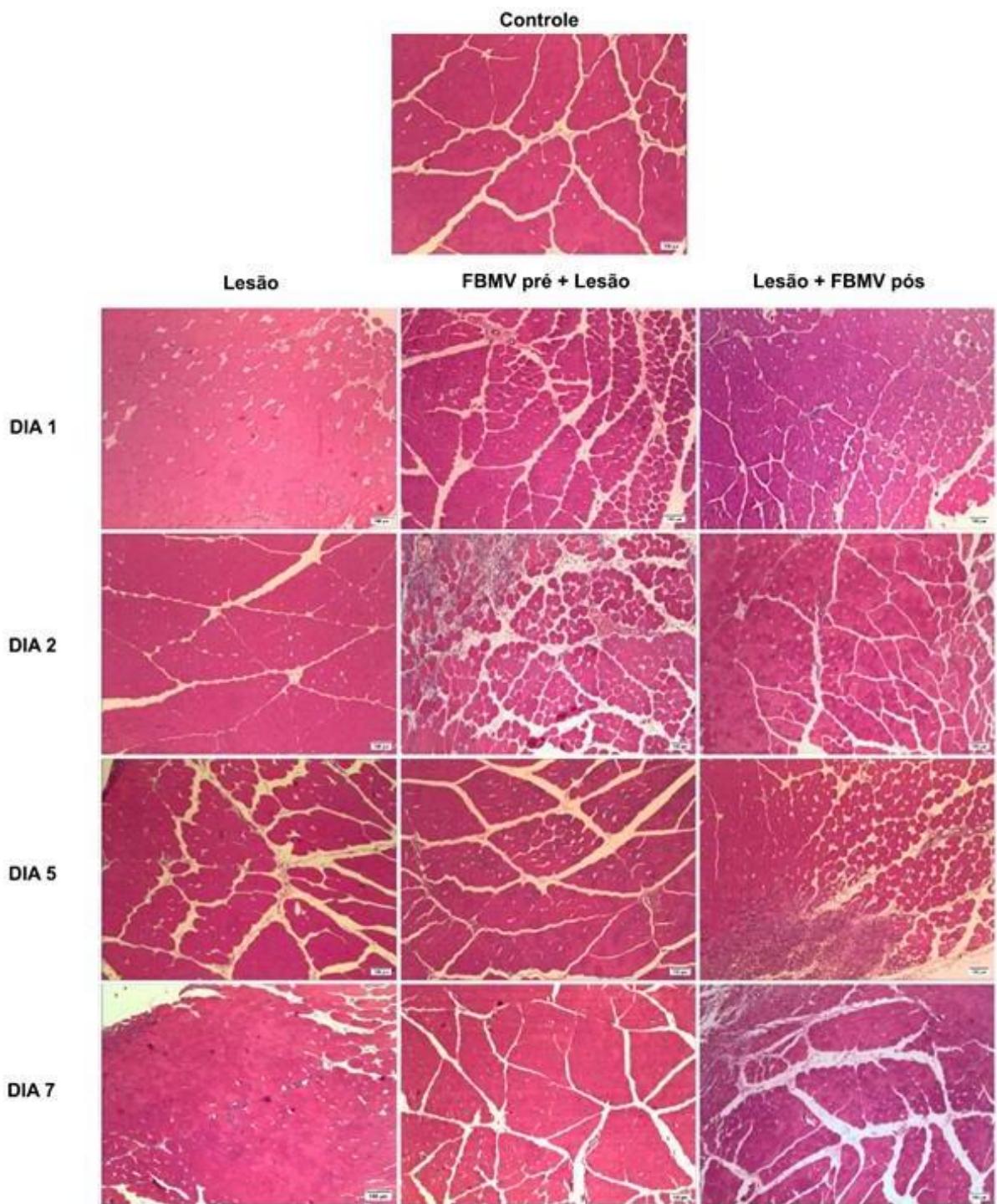


Figura 4. Avaliação morfológica dos cortes histológicos por eosina e hematoxilina (H&E). Imagens representativas de cada grupo e período experimental (magnificação: 100x). FBMV, fotobiomodulação vascular.

4.2 Análise morfológicas quantitativas relativa ao trofismo das fibras musculares por HE

4.2.1 Diâmetro

Os resultados obtidos para o diâmetro das fibras musculares estão apresentados na figura 5. No dia 1, a análise do diâmetro das fibras musculares revelou uma redução no grupo FBMV pré-lesão em relação ao grupo lesão e lesão+FBMV pós, semelhante ao comportamento observado na área de secção transversa (AST) (figura 6). Nos grupos Lesão e FBMV pós-lesão, houve aumento do diâmetro das fibras musculares em comparação ao controle.

Após 2 dias, o grupo que recebeu irradiação prévia apresentou uma redução no diâmetro das fibras musculares em relação ao grupo lesão, enquanto houve um aumento no grupo Lesão em relação aos demais grupos lesionados e tratados.

No dia 5, os grupos tratados (FBMV pré e pós-lesão) apresentaram uma redução no diâmetro das fibras musculares em relação ao grupo somente lesão. Neste período os resultados demonstraram a persistência do aumento no diâmetro no grupo Lesão em comparação ao controle.

Após 7 dias, todos os grupos tratados com FBMV exibiram valores de diâmetro das fibras musculares que não diferiram do grupo controle e apresentaram aumento em relação ao grupo Lesão.

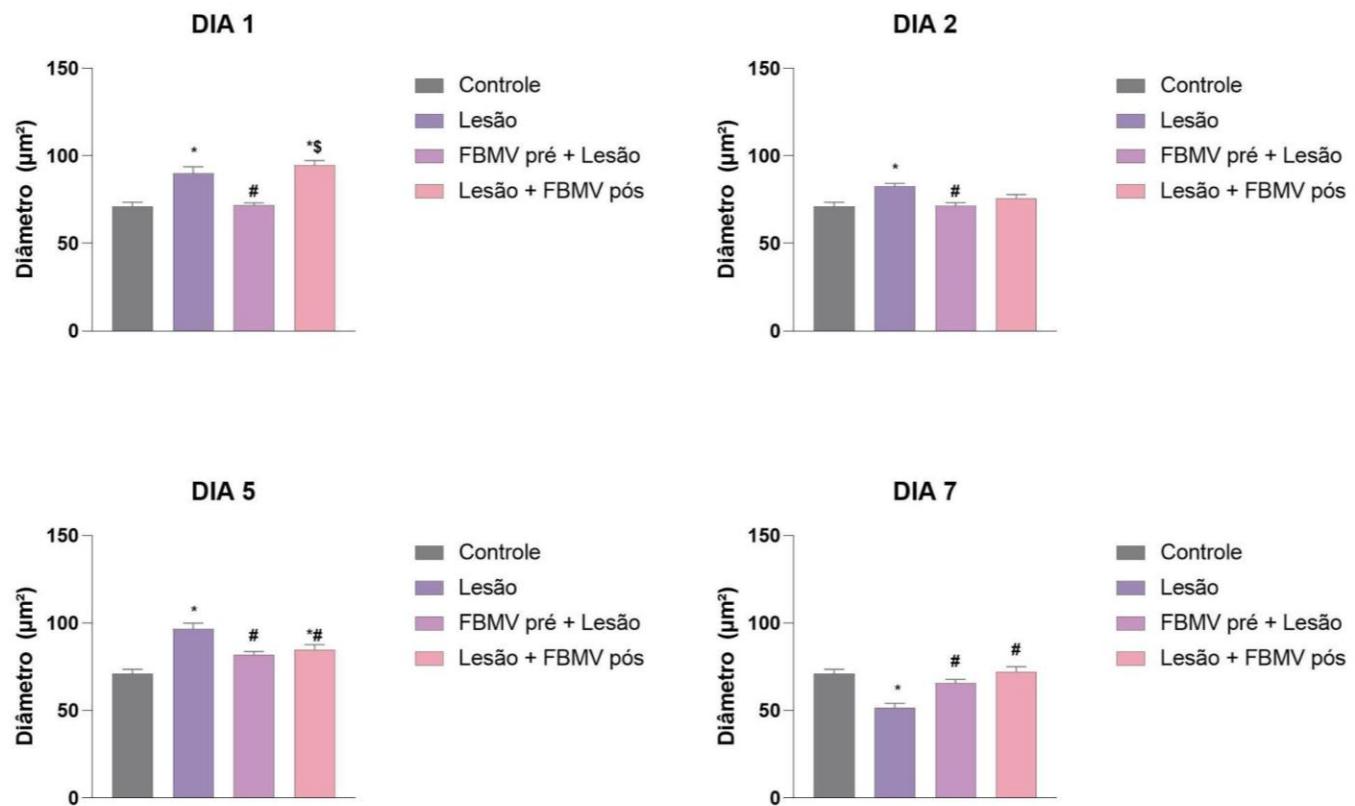


Figura 5. Análise quantitativa do diâmetro (μm) das fibras musculares avaliados nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular. * $P < 0,05$ vs Controle. # $p < 0,05$ vs Lesão. \$ $P < 0,05$ vs FBMV pré + Lesão.

4.2.2 Área de Secção Transversa

Os resultados de AST (figura 6) indicaram que, no dia 1, o grupo que recebeu FBMV preventivo apresentou valores de AST semelhantes aos do controle. Em contraste, os grupos, lesão e lesão + FBMV pós-tratamento exibiram um aumento nos níveis de AST em relação ao controle e somente lesão. No dia 2, não houve diferença estatística entre todos os grupos experimentais.

Após 5 dias, observou-se um aumento significativo da AST nos grupos lesão ($p = 0,0037$) e lesão + FBMV pós-tratamento ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo controle, sendo o aumento mais acentuado no grupo lesão + FBMV pós-tratamento. O grupo tratado pós-lesão também apresentou um aumento em relação ao grupo com tratamento preventivo ($p = 0,0095$). Porém o grupo com tratamento preventivo apresentou valores de AST próximos ao controle.

Após 7 dias, ambos os grupos tratados com FBMV demonstraram aumento da AST em comparação com o grupo somente lesão, sem diferença significativa entre os tratamentos preventivo e pós-lesão e ao grupo controle.

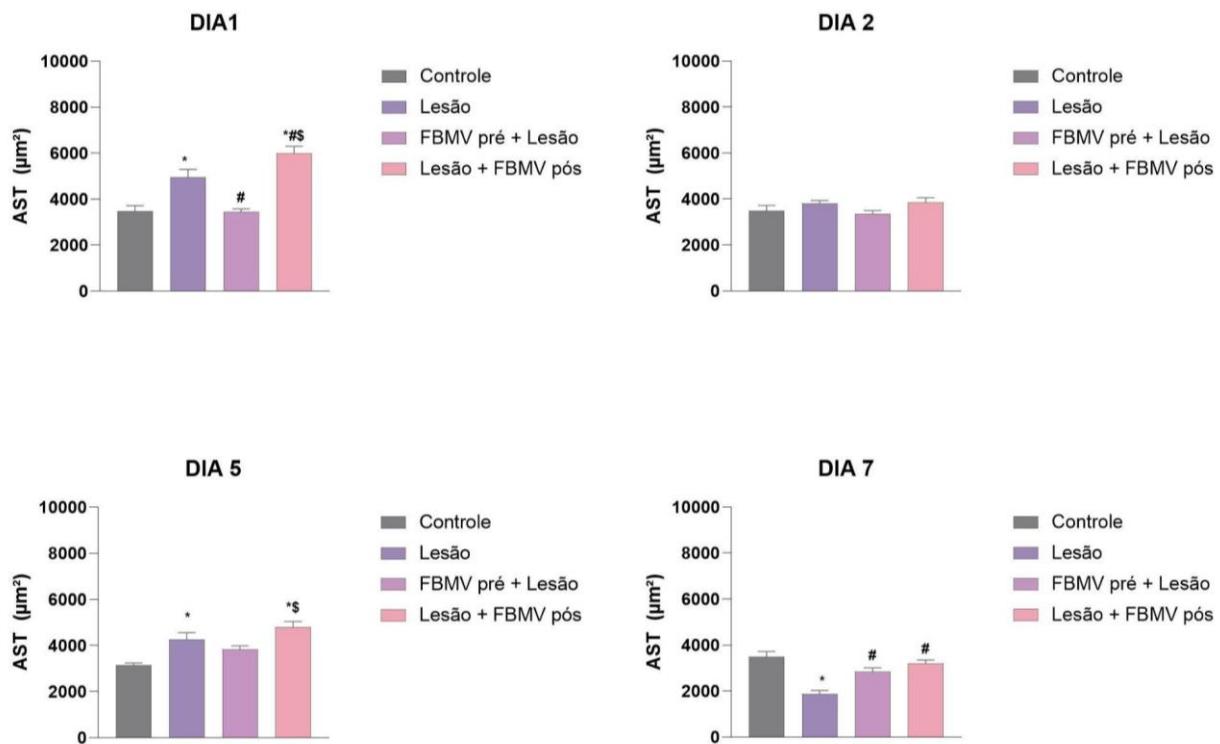


Figura 6. Análise da Área de Secção Transversa (μm) das fibras musculares nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular. * $P <0,05$ vs Controle. # $p <0,05$ vs Lesão. \$ $P <0,05$ vs FBMV pré + Lesão.

4.3 Análise de expressão gênica de Miostatina e MURF-1 por qPCR

4.3.1 Expressão de Miostatina

Os resultados do qPCR para miostatina estão apresentados na Figura 7. No primeiro e segundo dia, foi identificado um aumento significativo do grupo lesão em relação ao grupo controle ($p = 0,003$). Adicionalmente, houve redução significativa na expressão de miostatina em ambos os grupos tratados de forma preventiva e terapêutica (FBMV pré + lesão [$p = 0,0298$ e $p = 0,010$, respectivamente] e lesão + FBMV pós [$p = 0,0287$ e $p = 0,003$, respectivamente]) em comparação ao grupo lesão.

No quinto dia, os grupos controle e lesionados e tratados FBMV pré + lesão e lesão + FBMV pós apresentaram níveis reduzidos de miostatina em relação ao grupo lesão, porém não apresentaram diferença estatística entre eles.

Após sete dias, houve um aumento nos níveis de miostatina no grupo FBMV pré + lesão em comparação aos grupos controle ($p = 0,000162$) e nos grupos lesionados sem tratamento (lesão, $p = 0,0166$) e tratado de forma terapêutica (lesão + FBMV pós, $p = 0,0053$).

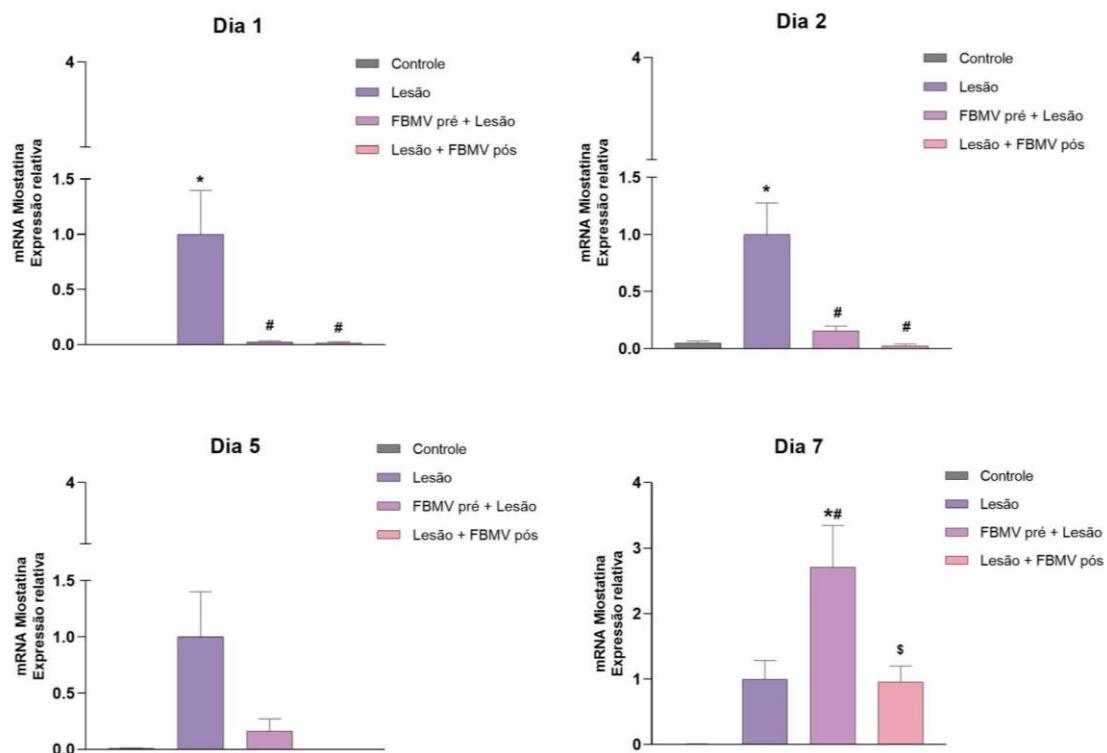


Figura 7. Expressão gênica de Miostatina normalizada pela expressão do grupo Lesão e avaliada nos grupos Controle, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA/Tukey). FBMV, Fotobiomodulação vascular * $p < 0,05$ vs Controle, # $p < 0,05$ vs Lesão, \$ $p < 0,05$ vs FBMV pré + Lesão.

4.3.2 Expressão gênica de MuRF-1

Os resultados do qPCR para MuRF-1 estão apresentados na Figura 8. No primeiro dia, o grupo lesão apresentou aumento relativo na expressão em comparação ao grupo controle ($p = 0,0031$). Adicionalmente, o grupo lesão + FBMV

pós exibiu redução na expressão de MuRF-1 em comparação ao grupo lesão ($p = 0,0099$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais após dois dias. No entanto, foi possível identificar a resposta de forma semelhante a apresentada no primeiro dia experimental.

No quinto dia, foi identificado o aumento na expressão do grupo lesão em comparação ao grupo controle e, especialmente, ao grupo FBMV pós-lesão ($p = 0,0430$ e $p = 0,0133$, respectivamente).

Por fim, no sétimo dia, tanto o grupo tratado com FBMV pré-lesão quanto o grupo tratado com FBMV pós-lesão apresentaram uma redução significativa na expressão de MuRF-1 em comparação ao grupo lesão ($p = 0,0105$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Adicionalmente, vale ressaltar que não houve diferença na expressão de MuRF-1 entre os grupos lesionados e tratados nos períodos avaliados.

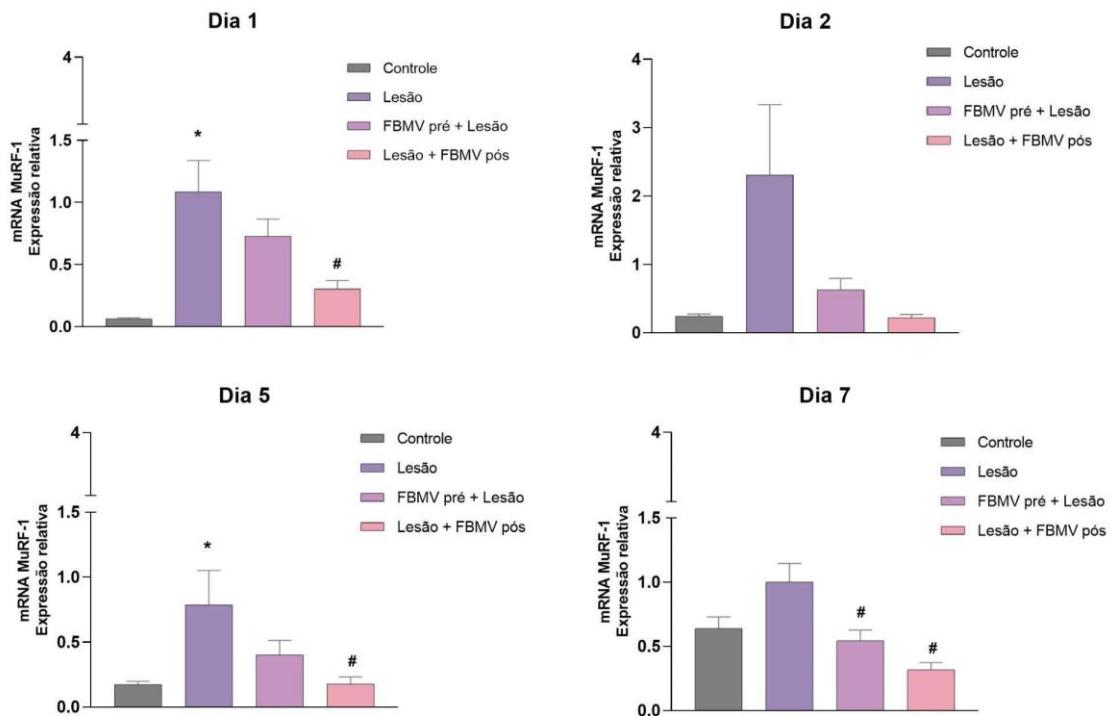


Figura 8. Expressão gênica de MuRF-1 normalizada pela expressão do grupo Lesão e avaliada nos grupos Controle, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA/Tukey). FBMV, Fotobiomodulação vascular * $p < 0,05$ vs Controle, # $p < 0,05$ vs Lesão.

5 DISCUSSÃO

A recorrência de lesões musculares, tanto em atletas quanto em indivíduos sedentários, representa um desafio significativo à capacidade de regeneração do tecido muscular, resultando em prejuízos funcionais, como redução do desempenho físico, comprometimento da execução de atividades diárias e diminuição da qualidade de vida. Esses impactos têm incentivado a busca por tratamentos adjuvantes capazes de otimizar o reparo e promover uma regeneração muscular mais eficiente.

Neste contexto, a FBM local tem sido amplamente empregada na prática clínica, demonstrando efeitos positivos no reparo e regeneração muscular. Entre seus benefícios estão o estímulo à angiogênese, o controle da ativação de células satélites musculares e a modulação do processo inflamatório. Por outro lado, a fotobiomodulação vascular (FBMV) destaca-se como uma abordagem que não requer previsibilidade de aplicação antes da lesão e, ao irradiar células sanguíneas, têm mostrado efeitos promissores na recuperação muscular em estudos mais recentes. Vale ressaltar que o mecanismo de ação pela FBMV baseia -se na irradiação das células presentes no sangue, diferindo da FBML que consiste em irradiar diretamente a estrutura muscular danificada e ainda sim, tem demonstrado efeitos semelhantes ou até superiores à aplicação local (31,44–49).

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da fotobiomodulação vascular (FBMV) aplicada em diferentes momentos — antes da lesão, em músculo saudável, ou após uma lesão aguda induzida — no modelo experimental de criolesão do músculo tibial anterior. O estudo buscou investigar a modulação de aspectos morfológicos relacionados ao trofismo muscular, bem como a expressão de proteínas-chave envolvidas nesse processo.

Para isso, foram utilizados parâmetros dosimétricos previamente validados na fotobiomodulação local (FBML) (33,50), que já demonstraram efeitos positivos no reparo muscular. Além disso, foram considerados estudos recentes que utilizaram a FBMV e relataram resultados promissores na recuperação muscular (42,46).

Apesar do avanço nas investigações, ainda existe uma lacuna no conhecimento sobre os efeitos específicos da FBMV na modulação dos aspectos morfológicos musculares, como a área de secção transversa (AST) e o diâmetro das fibras, especialmente neste modelo experimental. Embora poucos estudos comparem diretamente os efeitos da FBMV em parâmetros morfológicos, a fotobiomodulação, tanto local quanto vascular, tem consistentemente demonstrado benefícios no reparo muscular(41,51).

Recentemente, Bertin et al. (2022) (52), utilizando um modelo de lesão nervosa periférica completa para indução de atrofia no músculo tibial anterior, observaram que a

FBML (830 nm, 30 mW, 0,4 mJ/cm², único ponto no local da lesão, 480 J) produziu efeitos protetores significativos aos 5 e 14 dias, com valores próximos aos basais já no quinto dia.

Adicionalmente, estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa anteriormente, como o de Andreo et al. (2020)(53), utilizando um modelo de lesão de nervo periférico e aplicando os mesmos parâmetros do presente estudo (780 nm; 10 J/cm²; 40 mW; energia total de 3,2 J/cm²), combinaram a aplicação da FBML ao longo do trajeto do nervo ciático e no músculo tibial anterior, bem como de forma isolada em músculo ou nervo. Os resultados demonstraram que a FBML foi eficaz em aumentar a área de secção transversa (AST) e o diâmetro das fibras musculares após 3 e 4 semanas de tratamento.

Além disso, Martinelli et al. (2022) (45), em um modelo de hipertrofia compensatória, compararam os efeitos da FBMV (780 nm, 40 mW, 80 J/cm², 1 ponto aplicado sobre a veia/artéria caudal, total de 3,2 J) com os da FBML (780 nm, 40 mW, 10 J/cm² por ponto, 8 pontos, total de 3,2 J). O estudo revelou que ambas as modalidades induziram aumento na área de secção transversa (AST) e no diâmetro das fibras musculares, com efeitos mais pronunciados observados na aplicação da FBMV em relação à FBML aos 7 e 14 dias.

Adicionalmente, Tobelem et al. (2023) (44), em um modelo de lesão medular espinhal, avaliaram a aplicação da FBMV (780 nm, 40 mW, 80 J/cm², 1 ponto aplicado sobre a veia/artéria caudal, total de 3,2 J) realizada 2 horas após a lesão. Os resultados demonstraram aumento significativo na AST e no diâmetro das fibras musculares aos 7, 14 e 21 dias. Considerando que os parâmetros dosimétricos utilizados são os mesmos do presente estudo, os achados reforçam os efeitos positivos da FBMV na análise quantitativa da regeneração muscular. No presente estudo, os resultados demonstraram um comportamento semelhante com relação AST após 1 e 5 dias uma vez que observou-se um aumento no grupo tratado com FBMV pós-lesão em relação aos grupos controle e lesão, enquanto o grupo tratado previamente com FBMV manteve-se com valores semelhantes ao controle. Após 7 dias, ambos os grupos tratados, seja pré ou pós-lesão, apresentaram aumento em relação ao grupo apenas lesão, também atingindo níveis semelhantes aos da condição controle. Esses achados corroboram os resultados obtidos por Tobelem et al. (2023) e Martinelli et al. (2022) (44,45), destacando o efeito positivo da FBMV no aumento da AST de forma dependente do tempo.

Diferentemente dos resultados de Tobelem et al. (2023)(44), que relataram uma diminuição nos grupos com lesão medular espinhal (SCI), com ou sem tratamento, em relação ao controle no primeiro dia, sem diferenças estatísticas aos 3 e 7 dias, o presente estudo revelou que o tratamento prévio à lesão promoveu uma modulação positiva do diâmetro das fibras musculares, apresentando comportamento semelhante ao observado na AST. Nos grupos Lesão e FBMV pós-lesão, houve aumento do diâmetro em relação ao controle após 1 dia, com persistência dessa modulação aos 2 dias.

Após 5 dias, o grupo com FBMV prévia manteve a modulação constante, enquanto o grupo tratado com FBMV pós-lesão apresentou aumento em relação ao controle e redução em comparação ao grupo lesão. Já aos 7 dias, todos os grupos tratados com FBMV exibiram modulação e aumento em relação ao grupo apenas lesão, corroborando os resultados de Martinelli et al. (2022) (45).

Esses achados reforçam que o tratamento com FBMV, especialmente após a lesão, é eficaz em aumentar o diâmetro das fibras musculares. Além disso, a aplicação prévia à lesão apresenta um efeito protetor, mitigando o impacto inicial e, ao longo do tempo, promovendo o aumento do diâmetro das fibras, possivelmente devido a uma adaptação muscular mais eficiente.

A literatura corrobora esses resultados, evidenciando em diferentes modelos experimentais a capacidade da FBM de aumentar tanto o diâmetro quanto a área de secção transversa (AST) das fibras musculares. Esse efeito pode ser atribuído às propriedades bioestimuladoras da FBM, que incluem a ativação e proliferação de células satélites musculares, a indução de angiogênese, a modulação do processo inflamatório e a regulação da expressão de fatores de crescimento (31,46,49).

Considerando as proteínas avaliadas neste estudo, que desempenham papéis essenciais na regeneração muscular e na determinação do fenótipo das fibras musculares, observou-se que a FBMV foi capaz de modular sua expressão nos diferentes grupos experimentais analisados.

Em condições normais, o MuRF-1 apresenta baixa expressão, o que é benéfico em situações fisiológicas. Contudo, sua superexpressão em resposta a estímulos catabólicos crônicos pode levar à degradação de proteínas contráteis, resultando em atrofia muscular(13,15). No presente estudo, foi observado um comportamento constante quanto à expressão relativa dos grupos ao decorrer dos dias experimentais. No grupo lesão, verificou-se um aumento expressivo nos níveis de expressão em todos os tempos experimentais, principalmente em relação ao controle. Este comportamento pode ser explicado, devido ao papel do MURF - 1 no processo de diferenciação muscular (13). O comportamento dos grupos tratados pré e pós - lesão se manteve inferior ao grupo lesão, com efeitos pronunciados no grupo com tratamento pós durante todos os tempos experimentais, sugerindo um efeito modulatório.

O aumento da expressão de MuRF-1 pode ser atribuído ao seu papel no processo de diferenciação muscular. Esse comportamento sugere uma resposta inicial adaptativa que favorece o reparo e a regeneração do tecido muscular, estabilizando-se à medida que o processo regenerativo avança (13).

Nossos resultados demonstram que a modulação negativa dos grupos tratados (pré e pós-lesão) com FBMV ocorre após 7 dias, coincidindo com o aumento na AST e no

diâmetro das fibras musculares nesses grupos, em comparação ao grupo lesionado. Esses achados sugerem que a FBMV, de forma tempo-dependente, é capaz de regular os níveis de expressão de MuRF-1, contribuindo para o retorno do tamanho das fibras musculares à condição pré-lesão.

Resultados semelhantes foram relatados por Yonghua et al. (2024) (54), que utilizaram FBML (632,8 nm; 43,88 mW; 6 J/cm²; 10 min; contínuo) em um modelo experimental de caquexia induzida por adenocarcinoma de cólon em camundongos uma vez que observaram aumento da AST e melhora da atrofia muscular por meio da regulação negativa de MuRF-1 nos grupos com indução de caquexia após 12 dias, destacando a capacidade da FBM de modular o reparo muscular.

Em se tratando da miostatina, uma proteína pertencente à superfamília TGF-β que regula negativamente o crescimento muscular em condições fisiológicas e inibe fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento muscular, como MyoD e miogenina (9,55). Nossos achados demonstraram que o tratamento com FBMV foi capaz de reduzir a expressão de miostatina em até 5 dias, previamente ou pós lesão. No entanto, em 7 dias, foi observado aumento expressivo do grupo com tratamento prévio, diferenciando estatisticamente dos grupos controle e lesão.

Em contrapartida, a FBMV pós-lesão apresentou expressão semelhante ao grupo lesionado e reduzido quanto ao tratamento prévio. O aumento da expressão de miostatina no grupo FBMV prévia em 7 dias, sugere a otimização do processo de reparo. Essa hipótese é reforçada pelos resultados de AST e diâmetro das fibras musculares, que não evidenciaram impacto negativo no tamanho das fibras, especialmente considerando que a superexpressão de miostatina está associada à redução da área miofibrilar e da massa muscular (14).

Esses achados sugerem que a aplicação prévia de FBMV promove uma resposta mais robusta de modulação da miostatina nos primeiros dias, evoluindo para níveis aumentados durante a fase de reparo. Já a aplicação pós-lesão reduziu progressivamente a expressão de miostatina até 5 dias, o que é benéfico nessa fase, considerando seu papel inibitório no aumento da massa muscular, favorecendo assim a hipertrofia ou hiperplasia (9,14).

Estudos anteriores, como o de De Lima et al. (2018) (16), que utilizaram os mesmos parâmetros do presente estudo em aplicação local, também relataram redução dos níveis de miostatina no terceiro dia no grupo com irradiação prévia. Contudo, após 14 dias, os níveis estabilizaram, enquanto a combinação de tratamento prévio e pós-lesão resultou em aumento de expressão. Apesar dessas diferenças, a aplicação de FBMV prévia ou pós-lesão apresentou efeitos consistentes na literatura, incluindo modulação do processo inflamatório, organização do colágeno, redução da mionecrose e estímulo à

neovascularização(42,46,47). No entanto, a aplicação prévia mostrou efeitos mais pronunciados, reforçando seu potencial como estratégia terapêutica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, a terapia com FBMV infravermelho com os parâmetros utilizados neste estudo, foi capaz de modular o tamanho das fibras musculares em relação a AST e diâmetro em conjunto com a modulação negativa de fator de trofismo (MURF-1) e fator regulatório negativo (Miostatina), não havendo diferença entre aplicação de FBMV prévia ou pós lesão na fase de reparo muscular.

7 REFERÊNCIAS

1. Brooks S V. Current topics for teaching skeletal muscle physiology. In: American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education. 2003.
2. Constantin-Teodosiu D, Constantin D. Molecular mechanisms of muscle fatigue. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. 2021.
3. Sweeney HL, Hammers DW. Muscle Contraction. *J Physiol.* 1995;487:151–65.
4. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. Vol. 12, Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine. 2020.
5. I.Y. Shadrin, A. Khodabukus NB. Striated Muscle Function, Regeneration, and Repair. *Physiol Behav.* 2019;176(3):139–48.
6. Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med.* 2016;98.
7. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *2017;17(3):165–78.*
8. Vikne H, Strøm V, Pripp AH, Gjøvaag T. Human skeletal muscle fiber type percentage and area after reduced muscle use: A systematic review and meta-analysis. Vol. 30, Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports. 2020.
9. McPherron C, Lawler M, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [In Process Citation]. *Nature.* 1997;387(May).
10. Kruszewski M, Aksenov MO. Association of Myostatin Gene Polymorphisms with Strength and Muscle Mass in Athletes: A Systematic Review and Meta-Analysis of the MSTN rs1805086 Mutation. Vol. 13, *Genes.* 2022.
11. Sharma M, Langley B, Bass J, Kambadur R. Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc Sport Sci Rev.* 2001;29(4).
12. Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr Physiol.* 2013;3(4).
13. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. Vol. 307, American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism. 2014.
14. Demonbreun AR, McNally EM. Muscle cell communication in development and repair. Vol. 34, *Current Opinion in Pharmacology.* 2017.
15. Peris-Moreno D, Taillandier D, Polge C. MuRF1/TRIM63, master regulator of muscle mass. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18).
16. De Lima Rodrigues D, Alves AN, Guimarães BR, de Alcântara Araujo Amorim WW, Bussadori SK, Fernandes KPS, et al. Effect of prior application with and without post-injury treatment with low-level laser on the modulation of key proteins in the muscle repair process. *Lasers Med Sci.* 2018;33(6).
17. Wu Y, Che J, Jia P, Ma Y, Han Q, Wang X, et al. Near-infrared light-triggered polypyrrole promotes C2C12 cell differentiation and inhibits TNF- α induced myotube atrophy. *Cell Signal.* 2022;100.
18. Yang MG, Zhang Q, Wang H, Ma X, Ji S, Li Y, et al. The accumulation of muscle RING finger-1 in regenerating myofibers: Implications for muscle repair in immune-mediated necrotizing myopathy. *Front Neurol.* 2022;13.
19. Hamrick MW, Arounleut P, Kellum E, Cain M, Immel D, Liang LF. Recombinant myostatin (GDF-8) propeptide enhances the repair and regeneration of both muscle and bone in a

model of deep penetrant musculoskeletal injury. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*. 2010;69(3).

- 20. Wang M, Yu H, Kim YS, Bidwell CA, Kuang S. Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;426(1).
- 21. Zimowska M, Kasprzycka P, Bocian K, Delaney K, Jung P, Kuchcinska K, et al. Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration. *Muscle Nerve*. 2017;55(3).
- 22. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011;91(4).
- 23. Moriscot AS, Baptista IL, Bogomolovas J, Witt C, Hirner S, Granzier H, et al. MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance. *J Struct Biol*. 2010;170(2).
- 24. Perera S, Mankoo B, Gautel M. Developmental regulation of MURF E3 ubiquitin ligases in skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2012;33(2).
- 25. Rom O, Reznick AZ. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. *Free Radic Biol Med*. 2016;98.
- 26. Gumucio JP, Mendias CL. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. Vol. 43, *Endocrine*. 2013.
- 27. Wu J, Ren B, Wang D, Lin H. Regulatory T cells in skeletal muscle repair and regeneration: recent insights. Vol. 13, *Cell Death and Disease*. 2022.
- 28. Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, Da Silva DFT, Ribeiro BG, Alves AN, et al. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. *J Cell Mol Med*. 2018;22(10):4922–34.
- 29. Karu TI. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*. 2014;20(2).
- 30. Hamblin MR. Photobiomodulation or low-level laser therapy. Vol. 9, *Journal of Biophotonics*. 2016.
- 31. de Brito A, Alves AN, Ribeiro BG, Barbosa DVDE, Magalhaes EMR, Fernandes KPS, et al. Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. *Lasers Med Sci*. 2018;33(3).
- 32. Sertaje MRF, Gonçalves MLL, Gomes AO, Bruno LH, Fossati AL, Viarengo NO, et al. Vascular photobiomodulation in the treatment of children with temporomandibular disorders: Study protocol for a randomized, controlled, blind, clinical trial. *Medicine (United States)*. 2022;101(42).
- 33. Alves AN, Ribeiro BG, Fernandes KPS, Souza NHC, 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).
- 34. Adabbo M, Paolillo FR, Bossini PS, Rodrigues NC, Bagnato VS, Parizotto NA. Effects of Low-Level Laser Therapy Applied before Treadmill Training on Recovery of Injured Skeletal Muscle in Wistar Rats. *Photomed Laser Surg*. 2016;34(5).
- 35. B Cotler H. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. *MOJ Orthop Rheumatol*. 2015;2(5).
- 36. dos Santos TC, de Brito Sousa K, Andreo L, Martinelli A, Rodrigues MFSD, Bussadori SK, et al. Effect of Photobiomodulation on C2C12 Myoblasts Cultivated in M1 Macrophage-conditioned Media. *Photochem Photobiol*. 2020;96(4).
- 37. David AC, Silva LMG, Garcia Denegri ME, Leiva LCA, Silva Junior JA, Zuliani JP, et al. Photobiomodulation therapy on local effects induced by juvenile and adult venoms of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. 2022;220.
- 38. Fernandes KPS, Ferrari RM, Bussadori SK, Franca CM. Vascular Photobiomodulation. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2021 Mar 1;39(3):143–4.
- 39. de Melo CAV, Alves AN, Terena SML, Fernandes KPS, Nunes FD, da Silva D de FT, et al. Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle. *Lasers Med Sci*. 2016;31(3).

40. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA, Da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VCS, et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011;26(3).
41. Assis L, Yamashita F, Magri AMP, Fernandes KR, Yamauchi L, Renno ACM. Effect of low-level laser therapy (808 nm) on skeletal muscle after endurance exercise training in rats. *Braz J Phys Ther.* 2015;19(6).
42. Lopez TCC, Malavazzi TC dos S, Rodrigues MFSD, Bach EE, Silva DT, Hi EMB, et al. Histological and biochemical effects of preventive and therapeutic vascular photobiomodulation on rat muscle injury. *J Biophotonics.* 2022 May 19;15(5).
43. Ribeiro BG, Alves AN, Dias dos Santos LA, Cantero TM, Santos Fernandes KP, da Silva Dias D, et al. Red and infrared low-level laser therapy prior to injury with or without administration after injury modulate oxidative stress during the muscle repair process. *PLoS One.* 2016;11(4):1–13.
44. Tobelem D da C, Andreo L, Silva T, Malavazzi TCS, Martinelli A, Horliana ACRT, et al. Systemic vascular photobiomodulation accelerates the recovery of motor activity in rats following spinal cord injury. *Lasers Surg Med.* 2023 Aug 16;55(6):577–89.
45. Martinelli A, Andreo L, dos Santos Malavazzi TC, Terena SML, da Cruz Tobelem D, Bussadori SK, et al. Vascular photobiomodulation increases muscle fiber diameter and improves the gait during compensatory hypertrophy of plantar muscle in rats. *J Biophotonics.* 2022;15(12).
46. Malavazzi TC dos S, Andreo L, Martinelli A, Rodrigues MFSD, Horliana ACRT, Bussadori SK, et al. Preventive and therapeutic vascular photobiomodulation decreases the inflammatory markers and enhances the muscle repair process in an animal model. *J Photochem Photobiol B.* 2024 Jul 1;256.
47. Ramos FS, Maifrino LBM, Alves S, da Costa Aguiar Alves B, Perez MM, Feder D, et al. The effects of transcutaneous low-level laser therapy on the skin healing process: an experimental model. *Lasers Med Sci.* 2018;33(5).
48. Ramos L, Marcos RL, Torres-Silva R, Pallota RC, Magacho T, Mafra FFP, et al. Characterization of Skeletal Muscle Strain Lesion Induced by Stretching in Rats: Effects of Laser Photobiomodulation. *Photomed Laser Surg.* 2018;36(9):460–7.
49. Lovisetto R, Malavazzi TCDS, Andreo L, Rodrigues MFSD, Bussadori SK, Fernandes KPS, et al. Photobiomodulation Using Different Infrared Light Sources Promotes Muscle Precursor Cells Migration and Proliferation. *Photonics.* 2022;9(7).
50. Ribeiro BG, Alves AN, Santos LAD Dos, Fernandes KPS, Cantero TM, Gomes MT, et al. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers Surg Med.* 2015;47(7).
51. Gigo-Benato D, Russo TL, Tanaka EH, Assis L, Salvini TF, Parizotto NA. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med.* 2010;42(9).
52. Bertin JSF, Marques MJ, Macedo AB, de Carvalho SC, Neto HS. Effect of Photobiomodulation on Denervation-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Autophagy: A Study in Mice. *J Manipulative Physiol Ther.* 2022;45(2).
53. Andreo L, Mesquita-Ferrari RA, Grenho L, Gomes P de S, Bussadori SK, Fernandes KPS, et al. Effects of 660-nm and 780-nm Laser Therapy on ST88-14 Schwann Cells. *Photochem Photobiol.* 2021;97(1).
54. Li Y, Chen Y, Liao Y, Huang T, Tang Q, He C, et al. Photobiomodulation therapy moderates cancer cachexia-associated muscle wasting through activating PI3K/AKT/FoxO3a pathway. *Apoptosis.* 2024 Jun 1;29(5–6):663–80.
55. Piovesan RF, Fernandes KPS, Alves AN, Teixeira VP, Silva Junior JA, Martins MD, et al. Effect of nandrolone decanoate on skeletal muscle repair. *Int J Sports Med.* 2013;34(1).

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1. Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA.



Universidade Nove de Julho

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da fotobiomodulação vascular e local no recrutamento leucocitário medular e na expressão de fatores inflamatórios e miogênicos em modelo animal de lesão muscular aguda", protocolada sob o CEUA nº 1273010623 (ID 000396), sob a responsabilidade de **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** e **equipe; Aline Souza Silva ; Raquel Lira Ortiz da Silva** - 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 18/10/2023.

We certify that the proposal "Effect of photobiomodulation vascular and local photobiomodulation on marrow leukocyte recruitment and expression of inflammatory and myogenic factors in animal model of acute muscle injury.", utilizing 110 Heterogenics rats (110 males), protocol number CEUA 1273010623 (ID 000396), under the responsibility of **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari and team; Aline Souza Silva ; Raquel Lira Ortiz da Silva** - 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 10/18/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2023 a 08/2025 Área: Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 11 a 13 semanas Quantidade: 110

Linhagem: Wistar

Peso: 220 a 235 g

São Paulo, 14 de dezembro de 2023

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais
Universidade Nove de Julho



7.2 ANEXO 2. Publicação em co-autoria



Journal of Advances in Medicine and Medical Research

Volume 36, Issue 12, Page 90-100, 2024; Article no.JAMMR.128959
ISSN: 2455-8899, NLM ID: 101711724
(Past name: British Journal of Medicine and Medical Research, Past ISSN: 2231-0614,
NLM ID: 101570956)

Effects of Pompage Treatment Associated or Not with Photobiomodulation on Pain, Range of Motion, and Quality of Life in Patients with Neck Pain: A Controlled, Randomized and Double Blinded Study Protocol

Denise Cekaunaskas Kalil Lauand ^{a,b}, Aline Souza Silva ^{a,b},
Kimberly Silva Gomes ^{a,b}, Flávia Kalil Lauand ^{b,††},
Sandra Kalil Bussadori ^{a,b,c},
Cinthya Cosme Gutierrez Duran ^{b,c},
Kristianne Porta Santos Fernandes ^{b,††},
Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana ^{a,b}
and Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari ^{a,b,c,‡}

^a Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil.

^b Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil.

^c Postgraduate Program in Biophotonics-Medicine, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: <https://doi.org/10.9734/jammr2024/v36i128959>

Open Peer Review History:

This journal follows the Advanced Open Peer Review policy. Identity of the Reviewers, Editor(s) and additional Reviewers, peer review comments, different versions of the manuscript, comments of the editors, etc are available here: <https://www.sdiarticle5.com/review-history/128959>

† Graduation in Medicine;

‡ Research Professor;

§ Corresponding author. E-mail: raquel.mesquita@gmail.com;

Cite as: Lauand, Denise Cekaunaskas Kalil, Aline Souza Silva, Kimberly Silva Gomes, Flávia Kalil Lauand, Sandra Kalil Bussadori, Cinthya Cosme Gutierrez Duran, Kristianne Porta Santos Fernandes, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, and Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari. 2024. 'Effects of Pompage Treatment Associated or Not With Photobiomodulation on Pain, Range of Motion, and Quality of Life in Patients With Neck Pain: A Controlled, Randomized and Double Blinded Study Protocol'. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research* 36 (12):90-100. <https://doi.org/10.9734/jammr2024/v36i128959>.

7.3 ANEXO 3. Trabalhos apresentados no Fórum Internacional de Biofotônica (FIB) (2024).



7.4 ANEXO 4. Trabalho apresentado no I ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE INVESTIGACIÓN Y PRÁCTICA EN BIOFOTÓNICA (2024)

