



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

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

TAINÁ CAROLINE DOS SANTOS

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO VASCULAR (FBMV) TRANSCUTÂNEA
SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E O REPARO MUSCULAR EM
MODELO DE LESÃO AGUDA**

São Paulo, SP

2022

TAINÁ CAROLINE DOS SANTOS

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO VASCULAR (FBMV) TRANSCUTÂNEA
SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E O REPARO MUSCULAR EM
MODELO DE LESÃO AGUDA**

Tese apresentada à Universidade Nove de
Julho como pré-requisito para a obtenção
do título de doutora em Biofotônica
Aplicada às Ciências da Saúde.

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

São Paulo, SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Tainá Caroline dos.

Efeito da fotobiomodulação vascular (FBMV) transcutânea sobre o processo inflamatório e o reparo muscular em modelo de lesão aguda.
/ Tainá Caroline dos Santos. 2022.

101 f.

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

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

1. Reparo muscular. 2. Criolesão. 3. Fotobiomodulação sistêmica. 4. ILIB. 5. Laser em baixa intensidade.

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

CDU 615.831

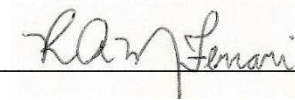
São Paulo, 15 de dezembro de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

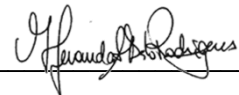
Aluno (a): Tainá Caroline dos Santos

Título da Tese: “Efeito da fotobiomodulação vascular (FBMV) transcutânea sobre o processo inflamatório e o reparo muscular em modelo de lesão aguda”.

Presidente: PROF^a. DR^a. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF^a. DR^a. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES



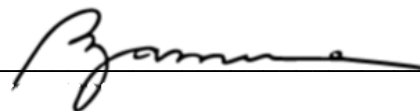
Membro: PROF^a. DR^a. MARCELA LETICIA LEAL GONÇALVES



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER



DEDICATÓRIA

Às bênçãos e graças que por Deus foram me dadas, pelo dom da vida e por tudo o que Ele tem me proporcionado. Que a Virgem Maria faça de minha vida um canto às misericórdias do Senhor.

Ao meu marido, Juliano, obrigada por despertar em mim tudo de melhor. Por incentivar meu trabalho e preencher minha alma apenas com o que vem do alto. Que eu tenha todo suporte da Mãe Santíssima para te cuidar. Que Deus nos ajude na missão de alcançar o verdadeiro e eterno céu um dia. No que compete aos esforços humanos para tal, conte comigo, meu amor. Eu te amo pela eternidade.

A doçura e a fortaleza de meus pais, Vera e Claudio, demonstraram a jóia que precisa ser preservada e defendida com todas nossas potências: a família. Não há nada que esteja à frente do bem dos meus. Quando era pequena e demonstrava insegurança diante de alguma situação, meu pai dizia que era preciso coragem - até hoje ele me ensina com sua resiliência e fortaleza. Minha mãe, com toda sua força e docilidade, sempre foi a personificação da feminilidade madura. Nos sustos, colo e afago. Ela readaptava tudo: trabalho, rotina, horários, nossas escolas. Cada sacrifício tinha um nome, uma prioridade: nossa família. Obrigada por me ensinar que nossos valores repousam na eternidade.

Minha irmã e cunhado, Tamires e Rodrigo, que vocês constituam uma família, seja como pais espirituais ou de filhos na terra, em Deus está a esperança. Agradeço a referência transmitida de se unir a alguém que tenha os olhos voltados para o alto.

Às famílias compostas por meus melhores amigos e seus filhos Sabrina, Cleber, Vicente e Alicia, Larissa, Thallysson, Noah e Lunna, Thais, José Valdir, ao anjo e ao filho que agora no ventre lhes foi confiado. Obrigada por transmitir tudo aquilo que é Bom, Belo e Verdadeiro.

É pela Verdade que vivo e é vital que vivamos por ela. Temos uma centelha da eternidade no amor que envolve nossa família - aí está a nossa luta. Aí está o sacrifício que nos é pedido: servi-los com os olhos voltados ao céu. Seguimos. Vale a pena.

AGRADECIMENTOS

Sequer consigo mensurar quantas pessoas estiveram me sustentando com suas orações e me ajudaram a chegar até aqui. Diversos fatores indiferentes ao meu mérito contribuíram para tanto.

*À minha querida orientadora, Professora **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**, quem me ensinou muito do que trago. Admiro-a por sua objetividade, determinação, dedicação e firmeza, sempre de forma serena. Certa vez, me deparei com a frase: “A inteligência é a capacidade humana de compreender a verdade”. Agradeço-a, imensamente, por me transmitir seus valores e o conhecimento da verdade.*

*À Professora **Kristianne Porta Santos Fernandes**, agradeço-a por seus ensinamentos, pela confiança e apoio. A quem possuo profunda admiração por sua afabilidade e pela realização de sua vocação com muita humildade.*

*À Professora **Maria Fernanda Setubal Destro Rodrigues**, por estar sempre presente e disposta a contribuir em todas as etapas deste trabalho. Admiro-a por seu empenho, paciência e ternura. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos, lições e confiança. Registro aqui todo meu carinho e admiração.*

*As Professoras **Sandra Kalil Bussadori** e **Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana**, pelo zelo, suporte e por toda a ajuda que foi fundamental e indispensável durante a execução desse trabalho. Deixo registrada toda minha admiração e carinho.*

*Agradeço aos membros da banca examinadora, aos Professores da casa **Rodrigo Labat Marcos** e **Stella Regina Zamuner** e a Professora **Ana Claudia Muniz Renno** pelo aceite, disponibilidade e contribuição para esta defesa.*

*As minhas queridas amigas **Tamiris Silva** e **Kaline Souza**. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, por todo o conhecimento repassado, por todo apoio necessário e o mais importante, por terem sido minhas amigas em todos os momentos. É uma alegria estar próximo de pessoas que nos elevam.*

Obrigada **Lucas Andreo, Andreia Martinelli e Daysi Tobelem**, por toda ajuda e ao apoio necessário durante a execução deste trabalho. Serei eternamente grata pelo companheirismo e carinho que me ofertaram. Tenho a sorte de tê-los e chamá-los de amigos.

Aos meus amigos do laboratório de Pesquisa, **Valéria, Gabriela, Tamires, Solange, Talita, Marcelo, Amanda, Verônica**, obrigada pela amizade construída e pelo maravilhoso convívio que sempre foi um ponto de incentivo para nossas rotinas.

Aos alunos de graduação que passaram pelo laboratório **Aline, Marcelo e Fernanda**, por toda a ajuda durante a realização dos experimentos, sempre dispostos e esforçados a aprender mais e mais.

Aos **funcionários do laboratório e biotério** da UNINOVE **Nubia, Nurya, Fernanda e André**, agradeço por todo auxílio, colaboração, convívio, paciência e amizade construída.

As **funcionárias e secretárias dos PPGs da UNINOVE, Adriana, Camila, Juliana**, agradeço por todo suporte necessário.

À **UNINOVE** pela bolsa de estudos concedida e por todo suporte necessário, bem como a **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado, assim viabilizando minha dedicação exclusiva para a execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer também a toda minha **família e amigos** que não estão citados nominalmente, por todo apoio, paciência, compreensão, sempre com muito amor e carinho.

Queres de verdade ser santo? - Cumpre o pequeno dever de cada momento: faz o que deves e está no que fazes. (Caminho. 815)

Constância, que nada desorienta. - Faz-te falta. Pede-a ao Senhor e faz o que puderes para obtê-la: porque é um grande meio para que não te separe do fecundo caminho que empreendeste. (Caminho. 990)

São Josemaría Escrivá de Balaguer

Criador Inefável [...] Dai-me a penetração da inteligência, a faculdade de lembrar-me, o método e a facilidade do estudo, a profundidade na interpretação e uma graça abundante de expressão. Fortificai o meu estudo, dirigi o seu curso, aperfeiçoai o seu fim. Vós que sois verdadeiro Deus e verdadeiro homem, e que viveis nos séculos dos séculos. (Oração para os estudos)

Santo Tomás de Aquino

RESUMO

A terapia de fotobiomodulação (FBM) tem demonstrado bons resultados no que se diz respeito a modulação do processo inflamatório e no processo de reparo muscular quando aplicada localmente. Contudo, são poucos os estudos sobre os mecanismos de ação da FBM vascular (FBMV), um método não-invasivo de irradiação vascular, sobre o reparo muscular. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da FBMV utilizando o laser em baixa intensidade (LBI) sobre o processo inflamatório e o reparo do músculo esquelético de ratos quando aplicado previamente ou após lesão muscular aguda induzida por criolesão no músculo tibial anterior (TA). Paralelamente, como objetivo secundário, foi

realizada uma revisão sistemática de literatura envolvendo a utilização da FBMV e ILIB (fotobiomodulação sistêmica) utilizando o LBI em modelos experimentais. Foram utilizados ratos Wistar, avaliados nos seguintes grupos experimentais: (1) Controle; (2) Não lesionado + FBMV; (3) Lesão; (4) FBMV pré + Lesão; (5) Lesão + FBMV pós. A FBMV foi realizada de forma pontual, em contato transcutâneo sobre a veia/artéria na base da cauda dos animais (780 nm; 40 mW; 0,04 cm²; 80 J/cm²). A eutanásia dos animais foi realizada nos tempos experimentais 1, 2, 5 e 7 dias após a indução das lesões. Os músculos TA foram coletados para análises histológica qualitativa e quantitativa por H&E e expressão proteica de TNF- α e MCP-1 por ELISA. Amostras de sangue foram coletadas e submetidas a um analisador hematológico automático quantitativo e contador diferencial de leucócitos. Os dados foram submetidos à análise estatística (ANOVA/Tukey). Os resultados apresentaram que a FBMV aplicada de forma prévia a lesão induziu o aumento de neutrófilos circulantes (granulócitos) após 1 dia e um aumento de monócitos após 2 e 5 dias em relação aos grupos Não Lesionado + FBMV e Lesão. Um aumento eritrocitário, assim como na concentração de hemoglobina foram observados no grupo Não Lesionado + FBMV nos dias 1 e 2 em comparação ao grupo Lesão. Não houve diferenças na avaliação dos componentes e coeficientes hematológicos, como o hematócrito, concentração de plaquetas, plaquetócrito e a amplitude da distribuição de plaqueta quando comparados todos os grupos experimentais. Em relação aos aspectos histológicos, apenas o grupo FBMV pré + Lesão apresentou redução do número de células inflamatórias após 1, 5 e 7 dias e aumento de vasos sanguíneos em 5 dias. Ambos os grupos FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentaram redução da mionecrose em 1, 2 e 7 dias, aumento de fibras novas e imaturas após 5 e 7 dias, além da neovascularização após 1, 2 e 7 dias. Com relação a expressão proteica, houve aumento de MCP-1 após 1 e 5 dias e TNF- α após 1, 2 e 5 dias no grupo Lesão + FBMV pós em comparação aos demais grupos experimentais. O grupo FBMV pré + Lesão apresentou aumento de MCP-1 após 2 dias em comparação aos grupos Não Lesionado + FBMV e Controle. No dia 7, o grupo Lesão continuou a apresentar aumento de expressão de MCP-1 em relação aos grupos FBMV. Em conclusão, a FBMV foi capaz de modular os aspectos hematológicos, os leucócitos circulantes, a expressão da quimiocina MCP-1 e da citocina pró-inflamatória TNF- α e o processo inflamatório evidenciando redução de mionecrose e restabelecimento da arquitetura tecidual com aumento de fibras musculares novas e imaturas e neovascularização, apresentando efeitos mais pronunciados quando a FBMV foi aplicada previamente a lesão muscular.

Palavras-chave: reparo muscular, criolesão, fotobiomodulação sistêmica, ILIB, laser em baixa intensidade

ABSTRACT

The photobiomodulation therapy (PBM) has shown positive effects concerning the modulation of the inflammatory process and on the muscle repair process when applied locally. However, there are few studies on the mechanisms of action of vascular photobiomodulation (VPBM), a non-invasive method of vascular irradiation, on muscle repair. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of VPBM using low-level laser (LLL) on the inflammatory process and skeletal muscle repair of rats when applied before or after cryoinjury-induced acute muscle injury in the tibialis anterior (TA) muscles. Concomitantly, as a

secondary objective, a systematic literature review was performed involving the use of non-invasive VPBM and ILIB (systemic photobiomodulation) using LLL in experimental models (Appendix A). To conduct this study, Wistar rats were used and evaluated in the following experimental groups: (1) Control; (2) Non-injured + VPBM; (3) Injured; (4) Prior VPBM + Injury; (5) Injury + post-PVBF. VPBM was performed in transcutaneous contact over the vein/artery at the base of the tail of the animals (780 nm; 40 mW; 0.04 cm²; 80 J/cm²). Euthanasia of the animals was performed at 1, 2, 5, and 7 days after induction of the injuries. TA muscles were collected for qualitative and quantitative histological analysis by H&E and protein expression of TNF- α and MCP-1 by ELISA. Blood samples were collected and submitted to a quantitative automatic hematological analyzer and a leukocyte differential counter. Data were subjected to statistical analysis (ANOVA/Tukey). The results showed that VPBM applied prior to injury induced an increase in circulating neutrophils (granulocytes) after 1 day and an increase in monocytes after 2 and 5 days in relation to the Non-Injured + VPBM and Injured groups. An increased in erythrocytes, as well as in hemoglobin concentration were observed in the Non-Injured + VPBM group on days 1 and 2 in comparison to the Injured group. There were no differences in the evaluation of hematological components and coefficients, such as hematocrit, platelet concentration, platelet count, and the amplitude of platelet distribution when comparing all experimental groups. Regarding histological aspects, only the Prior VPBM + Injured group showed a reduction in the number of inflammatory cells after 1, 5 and 7 days and an increase in blood vessels at 5 days. Both groups, Prior VPBM + Injured and Injured + VPBM after, showed a decrease of myonecrosis at 1, 2 and 7 days, an increase of newly and immature fibers after 5 and 7 days, and neovascularization after 1, 2 and 7 days. Regarding protein expression, there was an increase in MCP-1 after 1 and 5 days and TNF- α after 1, 2, and 5 days in the Injured + VPBM after group in comparison to the other experimental groups. The Prior VPBM + Injured group showed increased MCP-1 production after 2 days in comparison to the Non-Injured + VPBM and Control group. On day 7, the Injured group still shows an increase in MCP-1 protein expression when compared to the VPBM groups. In conclusion, VPBM was able to modulate hematological aspects, circulating leukocytes, the protein expression of the chemokine MCP-1 and the pro-inflammatory cytokine TNF- α and the inflammatory process, showing a reduction of myonecrosis and restoration of tissue architecture with increase of newly and immature muscle fibers and neovascularization, presenting more pronounced effects when the VPBM was applied prior to the muscle injury.

Keywords: muscle repair, cryoinjury, systemic photobiomodulation, ILIB, low-level laser

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Hematopoiese.....	18
Figura 2. Representação esquemática em fluxograma experimental.....	31
Figura 3. Representação ilustrativa do procedimento de criolesão.....	33
Figura 4. Representação ilustrativa do local de irradiação com a FBMV...	34
Figura 5. Delineamento experimental – Linha do tempo.....	35
Figura 6. Análise de leucócitos totais presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	40
Figura 7. Análise dos linfócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores absolutos e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	41
Figura 8. Análise dos linfócitos presente no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores relativo e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	42
Figura 9. Análise dos monócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores absolutos e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	43
Figura 10. Análise dos monócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores relativo e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	44
Figura 11. Análise dos granulócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores absoluto e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	45
Figura 12. Análise dos granulócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e	46

Lesão + FBMV pós apresentados em valores relativo e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	
Figura 13. Análise dos eritrócitos ($\times 10^{12}/L$) presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	47
Figura 14. Análise do volume corpuscular médio do sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).	48
Figura 15. Análise do coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos eritrócitos do sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	49
Figura 16. Análise da hemoglobina (g/dL) presente no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	50
Figura 17. Análise da concentração média de hemoglobina celular no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	51
Figura 18. Análise hemoglobina corpuscular média no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	52
Figura 19. Análise de plaquetas no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	53
Figura 20. Análise do volume plaquetário médio no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e	54

Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	
Figura 21. Análise da amplitude de distribuição de plaquetas no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	55
Figura 22. Análise plaquetócrito no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	56
Figura 23. Análise da produção proteica de TNF- α avaliados nos grupos Controle, Não Lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	57
Figura 24. Análise da produção proteica de MCP-1 avaliada nos grupos Controle, Não Lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7). Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	58
Figura 25. Avaliação morfológica dos cortes histológicos por eosina e hematoxilina (H&E). Imagens representativas de cada grupo e período experimental (magnificação: 200x). Indicação da presença de infiltrado inflamatório (*), mionecrose (seta), fibras novas e imaturas (círculo) e vasos sanguíneos (triângulo).....	60
Figura 26. Análise quantitativa do número de células inflamatórias/mm ² avaliados nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	62
Figura 27. Análise quantitativa de mionecrose/mm ² avaliados nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....	63
Figura 28. Análise quantitativa de vasos sanguíneos/mm ² avaliados nos grupos Controle, Lesão, Não Lesionado + FBMV, FBMV pré + Lesão e	65

Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....

Figura 29. Análise quantitativa de fibras novas e imaturas/mm² avaliados nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey).....

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos da FBMV.....	33
Quadro 1. Resumo dos resultados referentes a análise quantitativa hematológica de leucócitos totais e diferenciais.....	67
Quadro 2. Resumo dos resultados referentes a análise hematológica de parâmetros eritrocitários e plaquetários.....	68
Quadro 3. Resumo dos resultados referentes a análise de produção proteica e histológica.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlGaAs	Arseneto de gálio e alumínio
CK	Creatino-quinase
cm ²	centímetro quadrado
CS	Células Satélites Musculares
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	do inglês Enzyme linked immunosorbent assay
GaAlAs	Arseneto de Gálio-Aluminio
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LBI	Laser em baixa intensidade
MEC	Matriz extracelular
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
min	minuto
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mW	miliwatts
mW/cm ²	milliwatt por centímetro quadrado
M1	Macrófagos de fenótipo tipo 1
M2	Macrófagos de fenótipo 2
nm	nanômetros
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate-buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)
pH	Potencial hidrogênico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
TA	Tibial anterior
TGF- β	Fator de crescimento transformador β (do inglês, <i>Transforming Growth Factor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
μ L	microlitros
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1 Contextualização.....	17
Justificativa.....	27
2 Objetivos.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 Metodologia.....	30
3.1 Delineamento experimental.....	30
3.2 Procedimento de criolesão.....	32
3.3 Procedimento de tratamento com fotobiomodulação vascular (FBMV)	33
3.4 Coleta do sangue total e análise hematológica.....	35
3.5 Eutanásia dos animais e remoção dos músculos.....	36
3.6 Análise da expressão proteica por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	36
3.7 Avaliação morfológica por coloração Hematoxilina e Eosina.....	37
3.8 Análise estatística.....	38
4 Resultados.....	39
4.1 Análise hematológica quantitativa e contagem diferencial de leucócitos.....	39
4.1.1 Leucócitos totais.....	39
4.1.2 Linfócitos.....	40
4.1.3 Monócitos.....	43
4.1.4 Granulócitos.....	44
4.2 Análise hematológica eritrocitária.....	46
4.2.1 Eritrócitos.....	46
4.2.2 Concentração de Hemoglobina.....	49
4.3 Análise hematológica plaquetária.....	52
4.3.1 Plaquetas.....	52
4.4 Expressão proteica por ELISA.....	56
4.4.1 Análise da produção de TNF- α	56
4.4.2 Análise da produção de MCP-1.....	57
4.5 Análise morfológica qualitativa e quantitativa por H&E.....	59

4.5.1 Infiltrado inflamatório.....	61
4.5.2 Mionecrose.....	62
4.5.3 Vasos sanguíneos.....	63
4.5.4 Fibras novas e imaturas.....	65
4.6 Quadros resumos dos resultados.....	67
5 Discussão.....	70
6 Conclusão.....	85
7 Referências.....	86
8 Apêndice.....	97
8.1 Apêndice A.....	97
8.2 Apêndice B.....	98
9 Anexos.....	99
9.1 Anexo 1	99
9.2 Anexo 2	100

1 Contextualização

O músculo estriado esquelético é um dos tecidos mais abundantes do corpo humano e está frequentemente suscetível a lesões incluindo as de origem mecânica, isquêmica, térmica, proveniente de danos neurológicos, entre outros danos envolvendo agentes patogênicos (Yang and Hu, 2018). A lesão muscular é caracterizada pela perda da integridade tecidual levando a destruição da membrana plasmática das fibras musculares e da lâmina basal, causando o influxo de cálcio extracelular e consequentemente a degradação proteica (James G. Tidball, 2017; Yang and Hu, 2018).

O reparo em resposta ao exercício e as lesões ocorre pelo processo de regeneração da área lesionada, ou seja, a formação de novas fibras musculares que é possibilitada pela presença das células satélites musculares (CS), também denominadas células tronco musculares. Após uma lesão, ocorre a ativação das CS, antes em estado quiescente, que passam a proliferar sendo denominadas de mioblastos e as subsequentes fases de diferenciação que são compostas pela fusão dos mioblastos, formação de miotubos e sua maturação em fibras musculares (Chang and Rudnicki, 2014).

Devido aos danos causados a membrana das células musculares e ativação das CS, há a liberação de moléculas quimioatrativas constitutivas (IL-6), antes armazenadas, que medeiam o início da resposta inflamatória e induzem o intenso recrutamento das células de defesa para a área lesionada (Italiani and Boraschi, 2014; Kroner et al., 2014). Esses mediadores de caráter pró-inflamatório transmitem a informação à medula óssea, um órgão linfóide primário que atua na produção e reserva das células que compõem o sangue (Figura 1) (Mercier et al., 2012). O fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) se apresenta aumentado após a lesão, assim atua em sinergia com outras citocinas na mobilização de células tronco hematopoiéticas, na mielopoiese e principalmente na ativação de neutrófilos (Wright et al., 2015; Leitão et al., 2019).

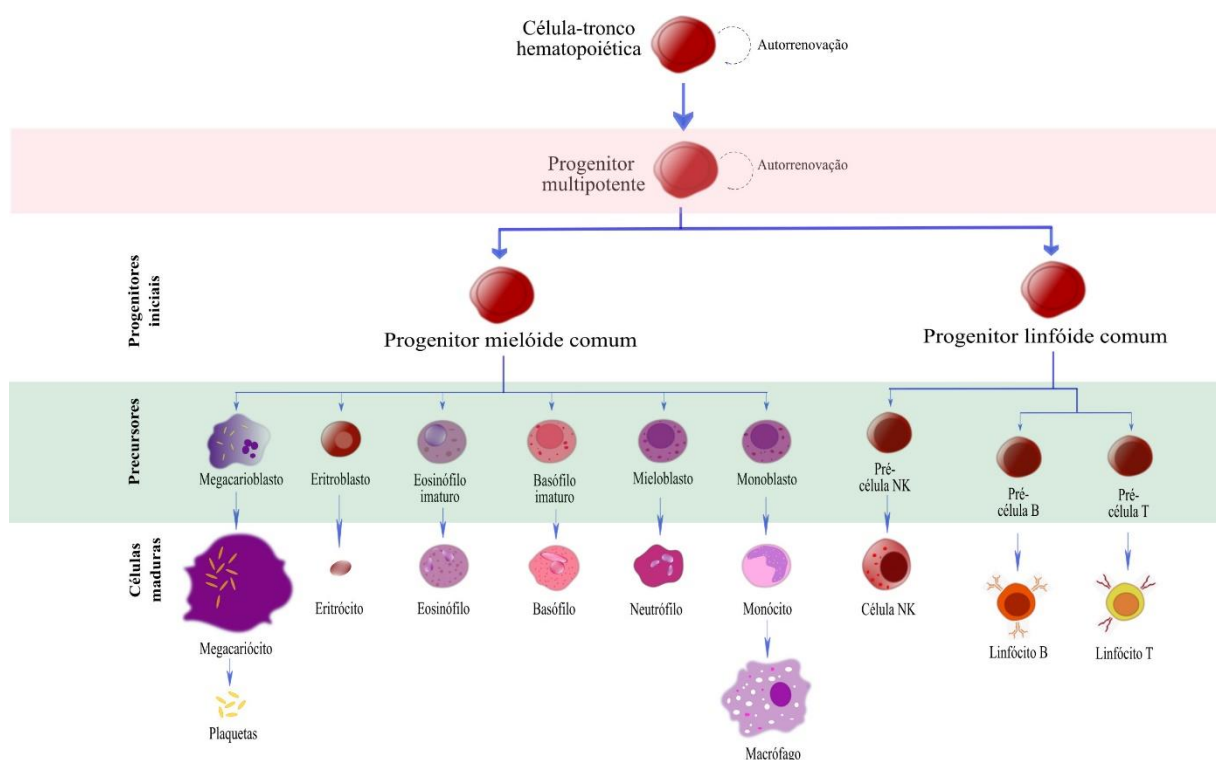


Figura 1. Hematopoiese. Fonte: própria (2020).

Os neutrófilos são as primeiras células mielóides a invadir a área de lesão, atingindo concentração máxima em cerca de quatro a seis horas e apresentando declínio após esse período (Chazaud et al., 2003b; Mosser and Edwards, 2008; Saclier et al., 2013; James G. Tidball, 2017). Essa prévia invasão possibilita a mudança no microambiente da lesão direcionando outras células de defesa, como os macrófagos, para a região através de fatores quimioatrativos (Saclier et al., 2013).

As quimiocinas, citocinas com poder quimiotático, também apresentam um importante papel no processo atrativo leucocitário vascular para o microambiente da lesão (Shireman et al., 2007). As quimiocinas da família C-C são reguladoras do recrutamento, migração e infiltração de monócitos/macrófagos, sendo a CCL2/MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócitos do tipo 1) relacionada aos mioblastos por meio da ativação extracelular da via de sinalização Erk1/2 (Henningesen et al., 2011). Estudos demonstraram que a MCP-1 pode ser secretada por células precursoras miogênicas (mioblastos) (Chazaud et al., 2003a), neutrófilos e macrófagos residentes (James G Tidball, 2017), desta forma apresentando funções auto- e parácrina no processo de formação dos miotubos e resultando no favorecimento

e regulação do processo de regeneração muscular em resposta a lesão (Henningsen et al., 2011).

Os macrófagos são considerados células chave-efetoras no processo de remodelamento tecidual. São células prevalentes da resposta imune e dominantes nas múltiplas fases do processo de reparo muscular, incluindo a fase inflamatória e regenerativa (Arnold et al., 2007; Italiani and Boraschi, 2014; James G. Tidball, 2017). Devido sua notável característica de plasticidade, são capazes de responder aos sinais do microambiente onde se encontram e de modificarem seu fenótipo a partir dos estímulos recebidos. Assim, os macrófagos consistem em uma combinação de seus distintos estados de ativação, expressando marcadores associados ao fenótipo M1 e M2 simultaneamente e apresentando predominância tempo-dependente para um deles (Mosser and Edwards, 2008; Italiani and Boraschi, 2014; Wynn and Vannella, 2017).

Os macrófagos são recrutados para o local da lesão muscular a fim de fagocitar os restos celulares advindos de produtos endógenos, DNA provenientes das células musculares necrosadas e os componentes da matriz extracelular (MEC), a fim de favorecer o microambiente para o desenvolvimento de um novo tecido (Bosurgi et al., 2011; Novak et al., 2014). Moléculas, especialmente citocinas, possuem a capacidade de se ligarem aos receptores de membrana do tipo toll-like (TLRs), resultando na ativação clássica dos macrófagos para o fenótipo M1 (CD68+, CD80+, Gpr18, Fpr2). A ativação para esse perfil celular é caracterizada pela produção de mediadores e produtos de caráter pró-inflamatório como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio e citocinas, sendo eles o óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas -1 β , -6, -23, além do aumento da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e as metaloproteínases de matriz (MMPs) (Bosurgi et al., 2011; Novak and Koh, 2013; Italiani and Boraschi, 2014; James G. Tidball, 2017).

A IL-6 é considerada uma citocina multifuncional, desempenhando importante papel no tecido muscular durante a resposta imune inata e adquirida. Ambas as citocinas IL-6 e TNF- α possuem influência diretamente no aumento da proliferação e migração de mioblastos e, quando em altas concentrações, causando a inibição do processo de diferenciação inicial em miotubos (Chazaud et al., 2003b; Saclier et al., 2013).

No período de três a quatro dias após a ocorrência da lesão, há sobreposição dos mediadores de caráter pró-inflamatório por citocinas de caráter anti-inflamatório, bem como fatores de crescimento, que atuam estimulando a expressão dos macrófagos para o perfil M2 (CD163+/CD206+, Egr2, Arg1). Neste momento os macrófagos consistem em uma população não-fagocítica capaz de estimular, por meio de seus produtos, o processo de reparo tecidual (IL-4, IL-10, TGF- β , baixas concentrações de TNF- α e a enzima arginase - que converte arginina em ornitina e uréia) principalmente na indução da fase de diferenciação e fusão dos mioblastos e na formação de miotubos no tecido muscular (Mosser and Edwards, 2008; Saclier et al., 2013; James G. Tidball, 2017; Wynn and Vannella, 2017).

Estudos *in vitro* demonstram que as interleucinas -4 e -10 (IL-4 e IL-10) são importantes citocinas responsáveis pela polarização dos macrófagos para perfil M2, apresentando autorregulação na perpetuação desse fenótipo (Saclier et al., 2013; James G. Tidball, 2017; de Brito Sousa et al., 2019). O fator de crescimento transformador beta (TGF- β) possui efeito multifuncional durante o reparo muscular, desde ação imununorregulatória durante a fase pró-inflamatória até os processos de ativação e diferenciação das CS. Por outro lado, o TGF- β é mais conhecido por ser um potente fator pró-fibrinogênico e importante regulador de fibrose tecidual por meio do controle da síntese, remodelamento e degradação da MEC, bem como influenciando a expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) (Mosser and Edwards, 2008; Delaney et al., 2017). Os fibroblastos são responsáveis pela produção dos componentes da MEC, com o objetivo de reconstruir as propriedades estruturais e reforçar a função contrátil do tecido muscular (Delaney et al., 2017). Sendo que o acúmulo de alguns componentes da MEC, podem resultar em fibrose tecidual (Kim and Lee, 2016; Delaney et al., 2017). Assim, enzimas proteolíticas possuem a função essencial na digestão de componentes individuais da MEC, as MMPs (Kim and Lee, 2016).

A mudança no fenótipo dos macrófagos M1 para M2 possui importante impacto no microambiente do tecido muscular. A inibição do recrutamento do fenótipo pró-inflamatório (M1) ao local da lesão resulta no prolongamento do estado necrótico das fibras musculares (Tedesco et al., 2010; Saclier et al., 2013; Fernandes et al., 2015). Por outro lado, a depleção do fenótipo anti-inflamatório

(M2) no processo de reparo é capaz de reduzir o diâmetro de fibras musculares imaturas (Tedesco et al., 2010; Saclier et al., 2013). Diante de condições controladas, o músculo lesionado é capaz de regenerar e apresentar morfologia e funcionalidade semelhantes ao tecido integro, porém, esse processo pode sofrer alterações como a desregulação da ativação fenotípica, influxo tecidual dos macrófagos e apresentar ineficácia e propensão ao desenvolvimento de fibrose desse tecido (Rodríguez et al., 2010; Tedesco et al., 2010; Fernandes et al., 2015; Kim and Lee, 2016).

Na busca de estratégias terapêuticas para um reparo mais efetivo, a fotobiomodulação (FBM) utilizando diferentes fontes de luz como o laser em baixa intensidade (LBI) ou diodo emissor de luz (LED), já comprovou na literatura seus efeitos terapêuticos benéficos durante o processo inflamatório e no reparo de lesões musculares (Assis et al., 2013; Ribeiro et al., 2015; Adabbo et al., 2016; Alves et al., 2016; de Melo et al., 2016; Ferraresi et al., 2016; Brito et al., 2017; de Lima Rodrigues et al., 2018; Souza et al., 2018). Esses efeitos em sua grande maioria se referem a aplicação local da FBM, diretamente no local da lesão muscular, tanto em modelos experimentais (Assis et al., 2013; Ribeiro et al., 2015; Adabbo et al., 2016; Alves et al., 2016; de Melo et al., 2016; Brito et al., 2017; de Lima Rodrigues et al., 2018; Souza et al., 2018) como também em diversos estudos clínicos (Ferraresi et al., 2015; L. Ramos et al., 2018; de Marchi et al., 2019; De Paiva et al., 2019; Dornelles et al., 2019).

A FBM apresenta um efeito modulador sobre inúmeros tecidos, sob diferentes condições, tendo como princípio a absorção dos fótons da fonte de luz incidida pelos fotorreceptores (cromóforos) presentes nas células e, que por meio de fotoquímica, promove alterações bioquímicas intracelulares (Karu, 2014). Dentre os diferentes cromóforos celulares, há interação em especial com a enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a citocromo C oxidase (CCO), resultando em aumento na produção de ATP através da enzima ATP sintase. A CCO é um fotorreceptor primário por conter cromóforos que absorvem a luz monocromática em seus diferentes espectros, sendo responsável pela transdução de sinais iniciais a níveis celulares e teciduais (Kreslavski et al., 2012; Karu, 2014; de Freitas and Hamblin, 2016).

Dentre os efeitos benéficos da FBM destacam-se a modulação do processo inflamatório no tecido muscular após a lesão, principalmente

evidenciada pela redução do infiltrado inflamatório local (França et al., 2013; Alves et al., 2014; Brito et al., 2017; Andreo et al., 2018; Souza et al., 2018) e pela modulação de mediadores inflamatórios e das células do sistema imune incluindo a redução da expressão gênica de *TNF- α* , *TGF- β* (Mesquita-ferrari et al., 2010) e *IL-6* (Souza et al., 2018), além do aumento da expressão de *IL-1 β* (Souza et al., 2018) e da produção proteica de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Assis et al., 2013; De Almeida et al., 2014; Mantineo et al., 2014); modulação e a otimização da transição fenotípica dos macrófagos (Andreo et al., 2018; Souza et al., 2018; Silva Junior et al., 2019).

Estudos também demonstraram efeitos positivos da FBM na morfologia do tecido muscular após o processo de lesão, incluindo a redução da área de mionecrose (Brito et al., 2017; Souza et al., 2018) e área da lesão (Adabbo et al., 2016), angiogênese (Alves et al., 2014; Adabbo et al., 2016; Brito et al., 2017; Andreo et al., 2018; Souza et al., 2018) e aumento do número de fibras musculares imaturas (Alves et al., 2014; Brito et al., 2017; Souza et al., 2018), além dos efeitos positivos na composição estrutural da MEC apresentando aumento da atividade gelatinolítica da MMP-2 e melhor organização do colágeno (Alves et al., 2014; Brito et al., 2017; Andreo et al., 2018) e redução da área de fibrose muscular (França et al., 2013).

Em se tratando de aplicação da FBM antes da indução da lesão, ou seja, em tecido saudável, foi evidenciado que o LBI aplicado de forma local apresentou resultados positivos no que se refere a redução da expressão de IL-6 (Alves et al., 2016), redução do infiltrado inflamatório, da mionecrose, favorecimento da angiogênese e no aumento de fibras imaturas, assim como o aumento da atividade enzimática da MMP-2 e consequente melhora na deposição e organização do colágeno (Ribeiro et al., 2015). Além disso, foi verificado que a FBM com LBI previamente à lesão também modulou o estresse oxidativo no tecido muscular em processo de reparo reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando a atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo (Ribeiro et al., 2016), e de proteínas envolvidas no trofismo muscular (calcineurina e cadeias pesadas de miosina) além de induzir redução de fatores de crescimento que atuam negativamente na regulação do crescimento muscular (miostatina) (de Lima Rodrigues et al., 2018).

Na prática clínica, ainda existe controvérsia com relação ao melhor protocolo a ser utilizado. Dados da literatura evidenciam a possibilidade de utilização da FBM prévia com intuito de redução de danos/lesões ou melhora do reparo das mesmas (Leal Junior et al., 2009; Baroni et al., 2010; De Almeida et al., 2011; de Almeida et al., 2012). Contudo, os resultados ainda são incipientes no que se refere à descrição dos mecanismos envolvidos quando realizada a aplicação da fototerapia em diferentes regimes (unicamente pré ou tratamento previamente e pós associados). Estudos com aplicação prévia da FBM em humanos demonstraram efeitos positivos sobre a fadiga muscular como redução de creatina quinase (CK) (Leal Junior et al., 2009; Baroni et al., 2010; De Almeida et al., 2011; De Marchi et al., 2012), de lactato sanguíneo (Leal Junior et al., 2009) de lactato desidrogenase (LDH) (Baroni et al., 2010; De Marchi et al., 2012) do estresse oxidativo pela modulação de SOD (De Marchi et al., 2012), aumento do desempenho muscular, além de atenuação na diminuição da força (Baroni et al., 2010) e da fadiga muscular (Leal Junior et al., 2009), evidenciando os resultados benéficos da aplicação prévia do laser também em humanos e fortalecendo a necessidade do entendimento dos mecanismos envolvidos nessa modulação positiva de forma a ajustar a melhor opção temporal a ser adotada para a FBM.

Dentre os distintos métodos de aplicação da FBM, no ano de 1981, os cientistas soviéticos foram os primeiros a registrar o uso da irradiação intravascular do sangue utilizando o LBI (do inglês *Intravascular or Intravenous Laser Irradiation of Blood* – ILIB). Desenvolvida inicialmente para o tratamento de doenças cardiovasculares e na melhora das propriedades reológicas sanguínea, é amplamente utilizada no oriente médio e Ásia como ferramenta terapêutica de doenças de nível sistêmico (Weber et al., 2007; Kazemi Khoo et al., 2013), que consiste na irradiação utilizando um cateter introduzido no vaso sanguíneo para a passagem da fibra ótica do LBI (Kazemikhoo et al., 2016). Porém, essa técnica foi aperfeiçoada para permitir sua utilização de uma forma não-invasiva, aplicada sobre os vasos sanguíneos de grosso calibre (artérias e veias), sendo nesse caso denominada de forma externa, transdérmica ou transcutânea, ou ainda, fotobiomodulação sistêmica (FBMS) (Moskvin, 2017) ou fotobiomodulação vascular (FBMV) (Fernandes et al., 2021; Lopez et al., 2022).

A FBMS tem demonstrado influência positiva no tratamento de diversas doenças, com efeitos sobre as células sanguíneas, sobre o plasma e diversos componentes estruturais endoteliais (Mikhailov, 2009), além de modular as células do sistema imune e neuroendócrino, apresentando não apenas influência sobre o sistema vascular, mas sobre todos os demais sistemas do organismo (Mikhailov, 2009, 2015; Momenzadeh et al., 2015).

Estudos clínicos conduzidos evidenciaram que o ILIB possui efeitos no tratamento de doenças metabólicas, apresentando como resultado final o reparo tecidual de úlceras em pacientes com diabetes mellitus tipo II (Kazemi Khoo et al., 2013; KazemiKhoo and Ansari, 2014; Kazemikhoo et al., 2016). Kazemi Khoo et al. (2013) avaliaram o uso do ILIB inserida através da veia cubital média (405 nm, 1,5 mW, 20 minutos de exposição/sessão por 10 a 15 sessões) e apresentaram a redução dos níveis plasmático de histidina, alanina e arginina, que são aminoácidos diretamente envolvidos na hiperglicemia e resistência à insulina e, em adição, detectaram a redução dos níveis de glicose após cada sessão do tratamento. Vale ressaltar que o balanço óxido nítrico sintase (NOS)/arginina/arginase se mostra necessário, pois a arginina é metabolizada por ambas enzimas na síntese de óxido nítrico (NO) ou ornitina, sendo que o NO em altos níveis acarreta em efeitos deletérios para diversos tecidos inclusive o muscular (Santos et al., 2020) e a ornitina está diretamente relacionada a doenças cardiovasculares.

Kazemikhoo et al. (2016) também demonstraram em pacientes diabéticos os efeitos do ILIB (630 nm, 1,5 mW, 0,01 cm², 30 minutos de exposição/sessão durante 10 a 15 sessões) na redução da expressão de arginase e do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), sendo que este último estimula a produção de IL-1 β e TNF- α . Adicionalmente, os autores do mesmo grupo de pesquisa compararam o efeito do ILIB nos espectros azul e vermelho (405 e 630 nm, respectivamente; 1,5 mW, 0,01 cm², 30 minutos de exposição/sessão durante 7 sessões) e evidenciaram que houve redução nos níveis de glicose sérica após cada sessão, porém sem diferenças quando comparadas entre as duas fontes de luz (KazemiKhoo and Ansari, 2014).

Estudos direcionados ao tratamento de artrite também demonstraram efeitos da FBMV (632,8 nm; 1 mW/cm²; 20 minutos/sessão) na redução da contagem de linfócitos T e B (Timofeyev et al., 2001), na redução da dor, melhora

na limitação do movimento articular e da qualidade de vida quando aplicada a FBMV de forma sublingual (635, 536 e 405 nm, simultâneos; 5 mW; 20 minutos/sessão) (Ailioaie et al., 2014). Foram também avaliados os efeitos da irradiação intravenosa (630, 536 e 405 nm; 5 mW; 10 minutos/sessão para cada comprimento de onda) em associação ao tratamento com os medicamentos Etanercept ou Tocilizumabe, resultando na redução da dor (Chiran et al., 2013), sinergismo anti-inflamatório e normalização na concentração das imunoglobulinas (Chiran et al., 2014).

Pacientes submetidos à angioplastia coronária e que foram imediatamente tratados com uma única irradiação de forma intravascular (808 nm; 100 mW/cm²; 9 J/cm², 90 s/sessão), onde o ILIB promoveu a modulação de interleucinas e fatores de crescimento séricos, sendo observada redução da produção proteica de IL-6 e IL-1 β e aumento de IL-10 e TGF- β 1, condizentes com um menor processo inflamatório local (Derkacz et al., 2013, 2014).

Estudos que concernem o uso da FBMV em modelos animais também possuem diferentes formas de aplicação e parâmetros dosimétricos, assim apresentando grande variação dos protocolos experimentais. Alguns estudos encontrados na literatura descrevem a irradiação de forma transcutânea sobre a artéria e veia caudal de ratos (Roshchina et al., 2003; Tomimura et al., 2014; Amjadi et al., 2019; Lopez et al., 2022).

Roshchina et al. (2003) avaliaram os efeitos da irradiação na hipotensão arterial (633 nm, 1mW, 2 min/sessão) e demonstraram a redução da lipoperoxidação e o controle do balanço hídrico cardíaco e hepático. Anos mais tarde, Amjadi et al. (2019) avaliaram os efeitos do laser intravascular (ILIB) em animais diabéticos, quando aplicado no mesmo local (450, 532, 638 e 808 nm; 0,01 mW; 2, 4, 6 e 8 min/sessão) sobre a modulação de enzimas envolvidas no processo oxidativo metabólico e encontraram um aumento das enzimas lecitina-colesterol acetiltransferase (LCAT) e paraoxonase (PON1), ambas envolvidas no metabolismo de HDL, quando avaliadas nos maiores tempos de tratamento e utilizando menores comprimentos de onda, além do aumento das enzimas antioxidantes catalase e FRAP.

Adicionalmente Tomimura et al. (2014) avaliaram os efeitos da irradiação transcutânea (780 nm, 40 mW, 90 s, 30 J/cm², 21 sessões) em modelo de ratos espontaneamente hipertensos e encontraram que a longo prazo, houve

modulação hemodinâmica levando a redução da pressão sanguínea, diastólica e redução da frequência cardíaca.

Outro modelo de aplicação da FBMV em modelos animais se dá por meio da irradiação transcutânea da veia ou artéria auricular (Tanin et al., 1996; Wang et al., 2016; F. S. Ramos et al., 2018). Tanin et al. (1996), utilizando este tipo de aplicação, observaram que a irradiação em coelhos (628 nm; 2-2,5 mW; 10 min; 10 sessões) submetidos a lesão nervosa periférica do nervo ciático foi capaz de aumentar a produção de hemoglobina, trombócitos, albumina (normalizando os níveis de proteína total) e induziu alterações na composição bioquímica com aumento dos níveis da enzima alanina aminotransferase (ALT), uréia, colesterol e redução da creatinina. Por outro lado, Wang et al. (2016) apresentaram que a FBMV com irradiação transcutânea da artéria auricular (650 nm, 100 mW, 30 min, 45 J/cm², 192 sessões) de coelhos hipercolesterolêmicos foi capaz de controlar os níveis de colesterol total, LDL e HDL, reduzir a deformação dos eritrócitos, além de atuar de forma sistêmica reduzindo a esteatose hepática e o infiltrado inflamatório no fígado e baço.

Já Ramos et al. (2018) avaliaram o efeito da FBMV utilizando laser na artéria auricular (660 nm; 3,213 J/cm²; 6,426 J; 900 s; 1 ou 2 sessões) no processo de reparo tecidual de modelos murinos (ratos Wistar) de lesão subcutânea e verificaram uma melhor organização da epiderme e disposição das fibras colágenas próximas ao ideal após irradiação única. Os estudos descritos reafirmam influência da FBMV não apenas sobre o sistema vascular, mas sobre os demais sistemas do organismo. Fortalecendo este ponto, a revisão realizada por (Tomé et al., 2020) evidenciou que os comprimentos de onda mais usados em ILIB incluem 630, 650, 890 e, mais recentemente, 450 nm que focam principalmente as ações sobre o endotélio vascular e todos os tipos celulares do sangue, além de seus componentes.

Devido a busca constante por recursos que possam otimizar o tratamento e recuperação funcional após lesões musculares, especialmente em condições nas quais estas são frequentes e por vezes ocorrem em extensas áreas, a FBMV surge como uma interessante possibilidade terapêutica.

Justificativa

Os efeitos positivos da FBM aplicada de forma local para a modulação do processo inflamatório e reparo muscular já estão bem estabelecidos na literatura (Mesquita-ferrari et al., 2010; França et al., 2013; Ribeiro et al., 2015, 2016; Alves et al., 2016; Brito et al., 2017; de Lima Rodrigues et al., 2018; Souza et al., 2018). A questão da terapia de FBM ser de fácil aplicação, não invasividade e não apresentar efeitos colaterais torna ainda mais atrativa como ferramenta de tratamento no manejo de lesões musculares. Neste contexto e considerando condições de acometimento sistêmico como doenças metabólicas, lesões extensas, distrofias e outras que possam afetar diretamente o tecido muscular, a FBMV torna-se uma possibilidade interessante visto que permite a aplicação de forma mais ampla, podendo atuar com integralidade devido sua preconização de ação sistêmica.

Em adição, uma recente publicação fortalece ainda mais essa hipótese visto que foi observada uma melhora promovida pela FBMV aplicada previamente a indução da lesão em animais no que se refere a redução dos marcadores bioquímicos creatina quinase (CK), alanina aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e lactato a níveis semelhantes ao comportamento dos animais não lesionados. Ainda neste estudo foi feita apenas a avaliação qualitativa de alguns aspectos morfológicos teciduais sendo evidenciada redução da área da lesão, sobre os aspectos histológicos como na redução do edema, mionecrose e no aumento de novas fibras musculares no grupo submetido a FBMV (Lopez et al., 2022).

Outra questão importante a ser avaliada no presente estudo é de como a aplicação da FBMV previamente ao acometimento da lesão poderia modular as fases do reparo muscular e do processo inflamatório, assim como seus efeitos sobre o recrutamento de células de defesa que participarão dos processos de reparo, o que propiciará no melhor entendimento dos efeitos biológicos e dos mecanismos envolvidos deste tipo de aplicação e possibilitará na sua utilização de forma preemptiva a condições potencialmente lesivas ao tecido muscular, como no caso de atletas de alta performance além de situações como cirurgias devidamente agendadas e previstas, atuando de forma sistêmica e portanto não havendo a necessidade da escolha ou determinação da área a ser tratada.

Dessa forma, há necessidade de estudar a eficácia desse recurso terapêutico em diferentes regimes, como na prevenção ou tratamento de maiores danos teciduais, promovendo um reparo muscular de melhor qualidade e menor duração, fatores estes que são muitas vezes determinantes para o rápido retorno de atletas ou pessoas frequentemente acometidas por lesão muscular às suas atividades.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da FBMV aplicada pré ou pós lesão muscular aguda sobre a composição celular circulante no sangue periférico, na síntese de mediadores inflamatórios e sobre aspectos histológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a composição do sangue periférico e a contagem diferencial de leucócitos por meio de analisador hematológico automatizado;
- Avaliar a expressão proteica de TNF- α e MCP-1 por ELISA;
- Avaliar os aspectos morfológicos qualitativos e quantitativos do músculo pela coloração H&E;

Objetivo secundário

- Fazer um levantamento na literatura de modelos experimentais que utilizaram a fotobiomodulação sistêmica com o LBI, abrangendo ILIB e FBMV como formas de irradiação (Apêndice A).

3 Metodologia

Os experimentos foram realizados no laboratório de pesquisa do programa de pós-graduação em Biofotônica Aplicada a Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). O estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Nove de Julho sob número de protocolo 4828060220/2020 (ANEXO 1). O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes ARRIVE 2.0 e os itens cumpridos estão descritos no Checklist (ANEXO 2).

3.1 Delineamento experimental

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*: var. albinus, Rodentia, Mammalia), com doze semana 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 e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo 1 – Controle:** Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento (n=5);
- **Grupo 2 – Não lesionado + FBMV:** Os animais não foram criolesionados e foram submetidos à FBMV (conforme os parâmetros descritos na tabela 1) (n=20);
- **Grupo 3 – Lesão:** Os animais foram criolesionados no músculo tibial anterior (TA) e não receberam tratamento (n=20);
- **Grupo 4 – FBMV pré + Lesão:** Os animais foram submetidos à FBMV 24 horas antes da criolesão do músculo TA (n=20);
- **Grupo 5 – Lesão + FBMV pós:** Os animais foram criolesionados no músculo TA e submetidos após 2h à FBMV (n=20).

Os animais dos grupos 2 a 5 foram eutanasiados após 1, 2, 5 e 7 dias após a criolesão, sendo 5 animais de cada grupo por período. Os animais Controle (grupo 1) foram eutanasiados sem distinção de período experimental.

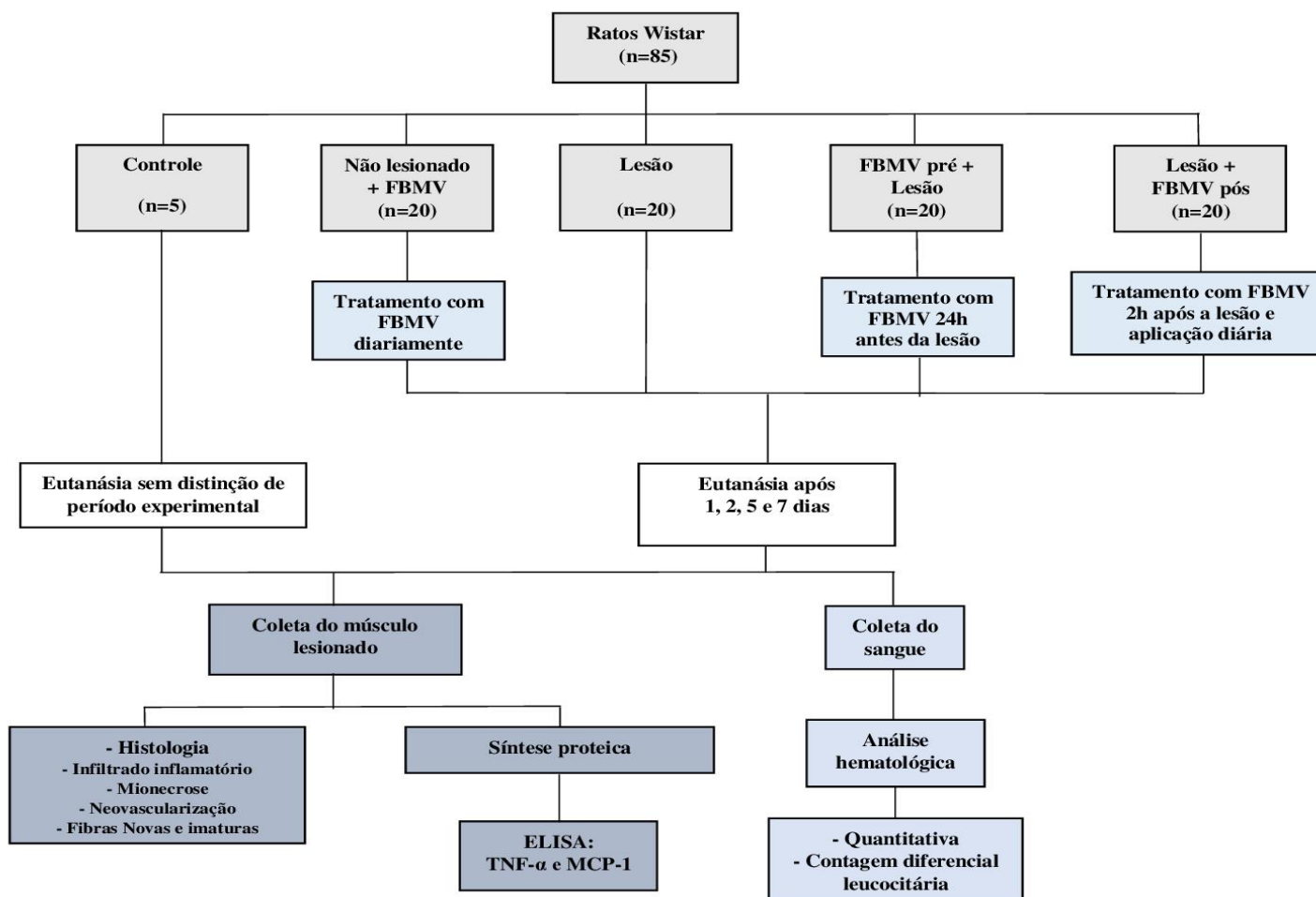


Figura 2. Representação esquemática em fluxograma experimental.

3.2 Procedimento de criolesão

Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com administração intraperitoneal de 100 mg/kg de ketamina 10% (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg de xilazina 2% (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 realizada a assepsia e tricotomia da área operada.

O músculo tibial anterior (TA), de ambas as patas posteriores, foi exposto cirurgicamente e submetido ao procedimento de Criolesão (Figura 3), modelo capaz de reproduzir a resposta natural do músculo frente às lesões, bem como a sua capacidade de regeneração, além de produzir lesões com características homogêneas, com área bem definida, de forma limpa, causando menor variabilidade na severidade da lesão, conforme descrito na literatura (Vatansever et al., 2012; Brunelli et al., 2014; Brito et al., 2017; Moreira et al., 2017; Andreo et al., 2018; da Silva Neto Trajano et al., 2018; Souza et al., 2018). 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 e foram mantidos em caixas plásticas sobre colchonete aquecido (36-37 °C) para evitar hipotermia e ficarão sob observação até estarem livres do efeito dos anestésicos.

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

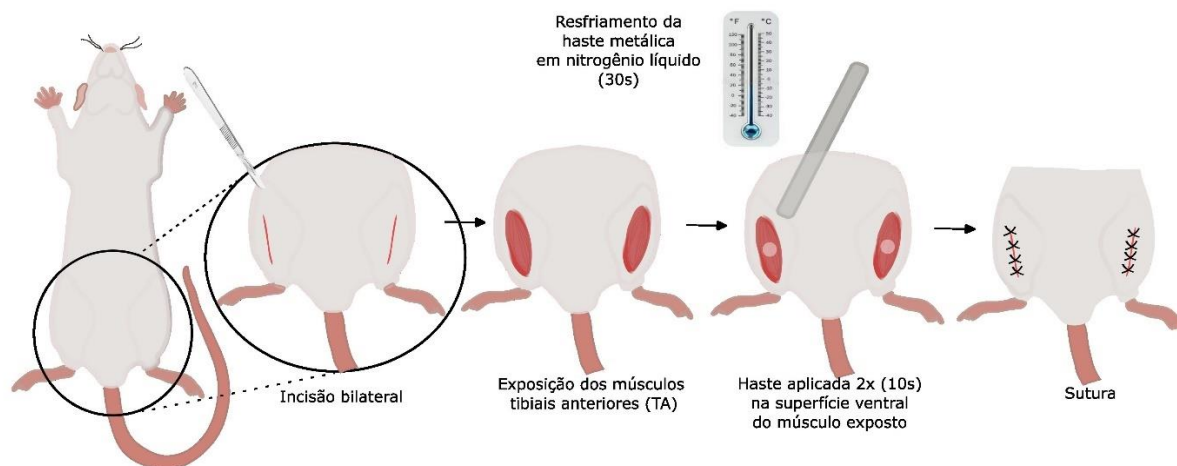


Figura 3. Representação ilustrativa do procedimento de criolesão. Fonte: própria (2022).

3.3 Procedimento de tratamento com 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 foi realizada em modo pontual e em contato no dorso caudal dos animais com os parâmetros descritos na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos da FBMV

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

Para a escolha dos parâmetros dosimétricos inicialmente foram observados as técnicas e locais de irradiação que utilizaram a FBMV no prévio levantamento da literatura de modelos experimentais (Apêndice A). Assim, foram

observados os estudos de Tomimura et al. (2014) e Yamaikina et al. (2012) nos quais os procedimentos de irradiação foram realizados com LBI no espectro infravermelho e de forma transcutânea sobre a veia/artéria caudal de ratos, semelhante ao método descrito no presente estudo. Além disso, estudos recentes demonstraram que leucócitos circulantes, incluindo os monócitos, linfócitos, neutrófilos, respondem diferentemente as fontes de luz dependendo de seu fenótipo e nível de ativação (Sousa et al., 2021). Assim, os parâmetros foram baseados em protocolos de estudos anteriormente publicados quando aplicados em 8 pontos no local da lesão, descrito por Ribeiro et al. (2015), Alves et al. (2016), Brito et al. (2017), Mesquita-Ferrari et al. (2010) e, em especial, ao estudo recentemente publicado ao qual foi conduzido pelo nosso grupo de pesquisa que utilizou a FBMV não-invasiva sobre a veia/artéria na base superior da cauda (Lopez et al., 2022), onde todos utilizaram comumente o espectro infravermelho (780 nm). Para evitar refração do feixe do laser, a aplicação foi realizada no ângulo de 90°C entre o emissor e a pele do animal (aplicação perpendicular), conforme demonstrado na figura 4.

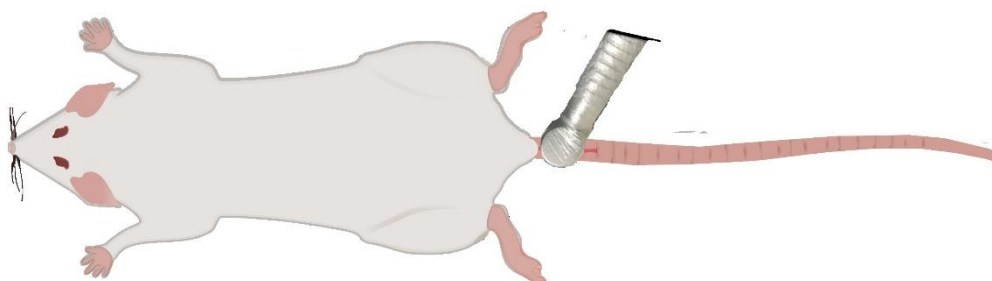


Figura 4. Representação ilustrativa do local de irradiação com a FBMV. Fonte: própria (2022).

O tratamento de FBMV nos animais do grupo FBMV pré+ Lesão foi aplicado de forma única 24 horas antes da lesão. Já os animais do grupo Lesão + FBMV pós as irradiações iniciaram 2 horas após o procedimento de criolesão, assim como nesse mesmo período para os animais dos grupos Não lesionado + FBMV, e posteriormente, o tratamento foi realizado com intervalos de 24 h, totalizando 1, 2, 5 e 7 sessões para os grupos avaliados nos tempos experimentais 1, 2, 5 e 7 dias, respectivamente, até o período de eutanásia de cada grupo experimental (Figura 5) (Lopez et al., 2022). No início e final do

procedimento experimental, a potência de emissão de luz do laser foi aferida utilizando o “Laser Check power meter” (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil).

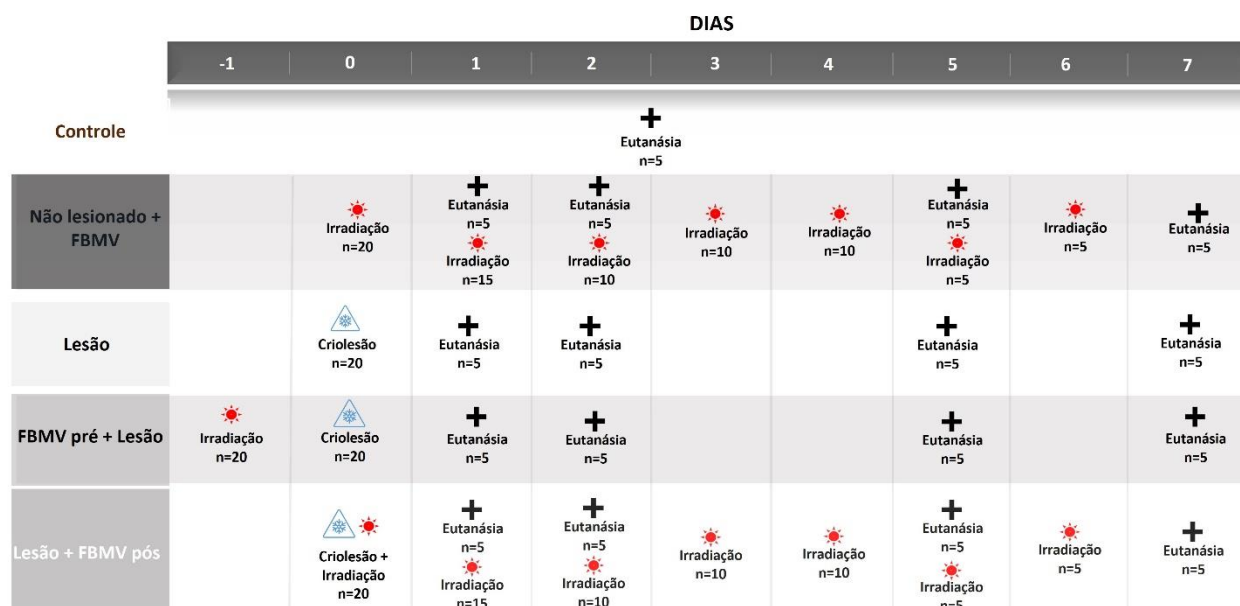


Figura 5. Delineamento experimental – Linha do tempo.

3.4 Coleta do sangue total e análise hematológica

Para a realização da punção intracardiaca os animais foram colocados em decúbito lateral, sob anestesia intraperitoneal, e foram coletadas amostras de sangue para análise. A identificação e quantificação dos parâmetros leucocitário, eritrocitário e plaquetário possibilita analisar a modulação da FBMV sobre a intensidade circulante no sangue periférico. Em seguida, uma agulha de 25x8 (Descarpac®; São Paulo, SP, Brasil), acoplada a uma seringa plástica de 1 mL contendo solução de ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (K2EDTA; Neon Reagentes Analíticos, Suzano – SP, Brasil) em concentração inicial de 1,5 mg/mL para a coleta na proporção de 1:10 de sangue. A agulha foi inserida pelo espaço intercostal até o ventrículo esquerdo e o sangue lentamente coletado.

Imediatamente após a coleta, o sangue foi acondicionado em microtubos em temperatura ambiente para consecutiva análise em um analisador hematológico automático quantitativo e um contador diferencial de leucócitos (BC-2800, Mindray, Shenzhen, China). O animal analisado, bem como a idade

destes, foi selecionado no equipamento para que fosse possível indicar os valores de referência mínimo e máximo para cada componente avaliado.

Os parâmetros avaliados compreendem desde as células de defesa, como: leucócitos totais, valores absolutos e relativos (%) para granulócitos (neutrófilos), monócitos e linfócitos; para parâmetros eritrocitários, como a contagem de eritrócitos, coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (variabilidade do tamanho das hemácias) e hematócrito (proporção de hemácias no volume sanguíneo total), volume corpuscular médio (tamanho médio das células), hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (tamanho médio das hemoglobinas), concentração de hemoglobina corpuscular média (concentração de hemoglobina das hemácias); Em relação aos parâmetros plaquetários, foi possível obter dados para o valor absoluto de plaquetas, volume plaquetar médio (tamanho médio), amplitude da distribuição de plaquetas (variabilidade do tamanho das plaquetas) e plaquetócrito (proporção de plaquetas no volume sanguíneo total).

3.5 Eutanásia dos animais e remoção dos músculos

Após a anestesia dos animais e coleta do sangue, por meio de punção intracardíaca, os animais entraram em choque hipovolêmico e em seguida para a remoção do músculo TA foi realizada previamente a assepsia do local, tricotomia e incisão para exposição total e remoção dos espécimes. O músculo TA da pata direita foi imediatamente inserido em solução de formol tamponado a 10% em PBS 1X (pH=7,4) e permaneceu por 24h, sendo posteriormente submetido ao processamento histológico. Já o músculo TA da pata esquerda foi seccionado transversalmente no centro do ventre e mantido em refrigeração (-80° C) para posterior de síntese proteica.

3.6 Análise da expressão proteica por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Para análise de expressão proteica, foram pesados entre 80-100 mg de tecido e submetidos a homogeneização (PowerGen 125 Homogenizer, Fisher Scientific®) com tampão de extração RIPA e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0.1 mM. O extrato tecidual foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado a -80°C até o momento da análise. A quantificação de proteína total foi realizada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A expressão proteica de TNF- α e MCP-1 nos extratos musculares foram avaliadas por meio do ensaio imunoenzimático ELISA utilizando kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para TNF- α (DY510-05) e MCP-1 (DY3144-05) seguindo as instruções do fabricante.

3.7 Avaliação morfológica por coloração Hematoxilina e Eosina

As amostras musculares foram mantidas em formol tamponado a 10% (pH 8,0) temperatura ambiente e utilizadas para análise morfológica. Para isso, 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 Xilol (Reagen). As amostras foram incubadas por 12h a 60°C em parafina (paraplast, Sigma, USA) e incluídas transversalmente no bloco. Foram realizados 3 cortes de 10 μ m de espessura em micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha), 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: infiltrado inflamatório, mionecrose, vasos sanguíneos e fibras novas e imaturas.

Para permitir a análise quantitativa destes aspectos foram consideradas 3 áreas por lâmina de 5 animais/grupo. Esses campos foram fotografados utilizando um microscópio de luz convencional (Zeiss Axioplan2, Alemanha) com objetiva de 20X (magnificação: 200X), para permitir a contagem dos aspectos descritos através do software Image J (National Institute of Health - NIH, EUA).

O infiltrado inflamatório foi contabilizado pela contagem absoluta dessas células. Aspectos de mionecrose foram identificados pela apresentação disforme das fibras, com aspecto de rompimento e fragmentação. As fibras novas e imaturas foram identificadas e quantificadas pela presença de núcleo centralizado e a os vasos sanguíneos pela presença de estruturas tubulares, rodeadas por uma túnica e presença de hemácias centrais.

A calibração das imagens foi realizada de acordo com a escala e transformação de *pixels* para valores de altura e comprimento. A determinação da área em mm², foram dadas pela multiplicação dos valores de largura e comprimento (em mm) e a contagem absoluta das células ou aspectos analisados foram corrigidos com o valor determinado da área. Após, os dados submetidos à análise estatística.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, USA). O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinação da distribuição dos dados. Para os dados paramétricos os valores foram expressos em média \pm erro padrão e foram analisados estatisticamente utilizando o teste de Variância de uma via (ANOVA) seguido do teste pós-hoc de Tukey. Para os dados não-paramétricos os valores foram expressos em mediana e intervalo interquartil, analisados estatisticamente utilizando o teste Kruskal-Wallis e o teste de Dunn's para avaliar a diferença entre os grupos. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 5\%$.

4 Resultados

4.1 Análise hematológica quantitativa e contagem diferencial de leucócitos

4.1.1 Leucócitos totais

Os valores de referência respectivos para leucócitos totais da espécie e idade dos animais utilizadas no presente estudo (ratos Wistar com 12 semanas de vida) foram fornecidas de forma automática pelo equipamento utilizado para leitura das amostras e apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas, sendo o valor mínimo de $2,9 \times 10^9/L$ e máximo de $15,3 \times 10^9/L$ (Fig. 6).

No dia 1 os resultados da análise quantitativa dos leucócitos totais evidenciaram uma redução nos grupos Lesão ($p < 0,001$) e Não Lesionado + FBMV ($p < 0,001$) em comparação ao grupo Controle. Já os grupos lesionados e tratados (FBMV pré+ Lesão, $p < 0,001$; Lesão + FBMV pós, $p = 0,006$) apresentaram aumento na contagem em relação ao grupo Lesão. No dia 2 após a lesão, o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou aumento da contagem absoluta de leucócitos em comparação aos grupos Lesão + FBMV pós ($p = 0,03$), Não Lesionado + FBMV ($p = 0,006$) e Controle ($p = 0,04$). Não foram demonstradas diferenças entre os demais grupos avaliados nesse período (Fig. 6).

Analisando os resultados da contagem de leucócitos totais após 5 dias, foi possível verificar que o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou um aumento em comparação aos demais grupos tratados (Não Lesionado + FBMV, $p < 0,001$; Lesão + FBMV pós, $p = 0,04$). Por outro lado, o grupo Não Lesionado + FBMV apresentou redução em comparação aos grupos Controle ($p = 0,002$) e Lesão ($p = 0,04$). Não houve diferença significativa entre os grupos no dia 7 (Fig. 6).

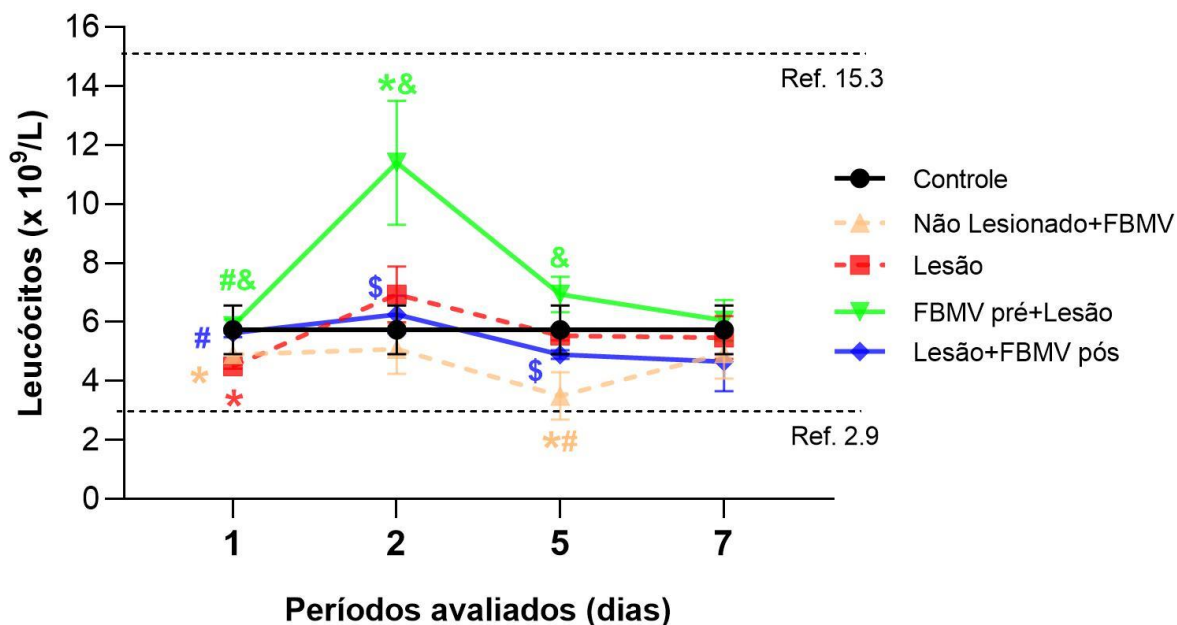


Figura 6. Análise de leucócitos totais presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p < 0,05$ vs. Lesão, \$ $p < 0,05$ vs. FBMV pré+Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

4.1.2 Linfócitos

Os valores de referência para os linfócitos estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas. Para a contagem absoluta (Fig. 7) e relativa (Fig. 8) foram determinados os valores mínimos de $2,6 \times 10^9/L$ e 63,7% e máximo de $13,5 \times 10^9/L$ e 90,1%, respectivamente.

Os resultados da análise absoluta (Fig. 7) dos linfócitos evidenciaram que não houve diferença significativa entre os grupos nos períodos de 1, 2, 5 e 7 dias.

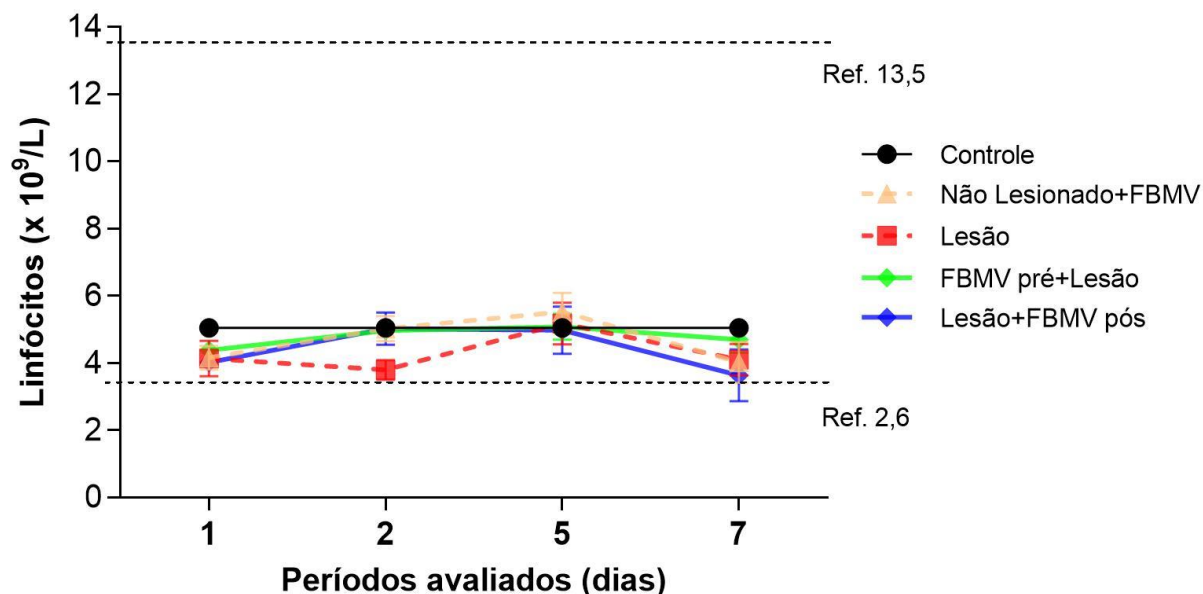


Figura 7. Análise dos linfócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores absolutos e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

Os resultados referentes a análise relativa dos linfócitos (Fig. 8) não apresentaram diferença entre os grupos avaliados no dia 1. No dia 2, o grupo Não Lesionado + FBMV apresentou aumento na presença de linfócitos em comparação ao grupo Controle ($p=0,003$). Já os grupos tratados apresentaram aumento no percentual de linfócitos em comparação ao grupo Lesão, sendo Não Lesionado + FBMV ($p<0,001$), FBMV pré+ Lesão ($p=0,001$) e Lesão + FBMV pós ($p<0,001$). Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística entre eles.

Não houve diferença significativa entre os grupos na análise relativa de linfócitos nos períodos de 1, 5 e 7 dias.

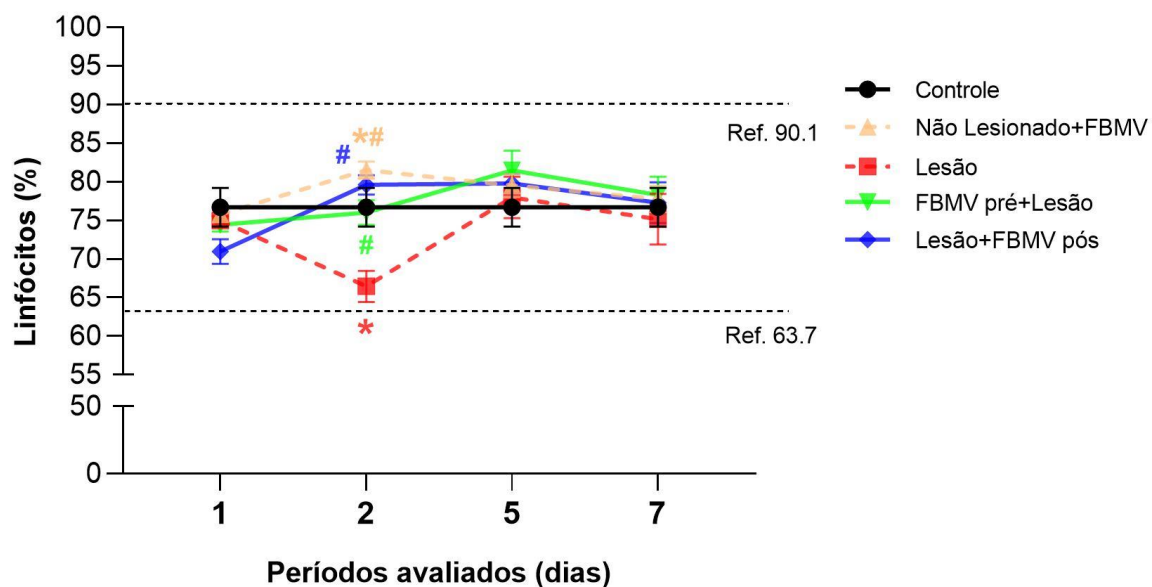


Figura 8. Análise dos linfócitos presente no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores relativo e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, # $p < 0,05$ vs. Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

4.1.3 Monócitos

Os monócitos circulantes não apresentaram diferença estatística entre os grupos nos valores da análise absoluta (Fig. 9) no dia 1. Já o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou aumento absoluto dos monócitos em comparação ao grupo Não Lesionado + FBMV nos dias 2 ($p=0,02$) e 5 ($p=0,01$) e em comparação ao grupo Lesão no dia 5 ($p=0,05$). Os grupos lesionados e tratados não apresentaram diferença entre eles nos períodos avaliados. Não houve diferença significativa entre os grupos no dia 7.

Os valores de referência respectivos para os monócitos presentes no sangue periférico estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas. Para a contagem absoluta (Fig. 9) e relativa (Fig. 10) foram determinados os valores mínimos de $0,0 \times 10^9/L$ e 1,5% e máximo de $0,5 \times 10^9/L$ e 4,5%, respectivamente.

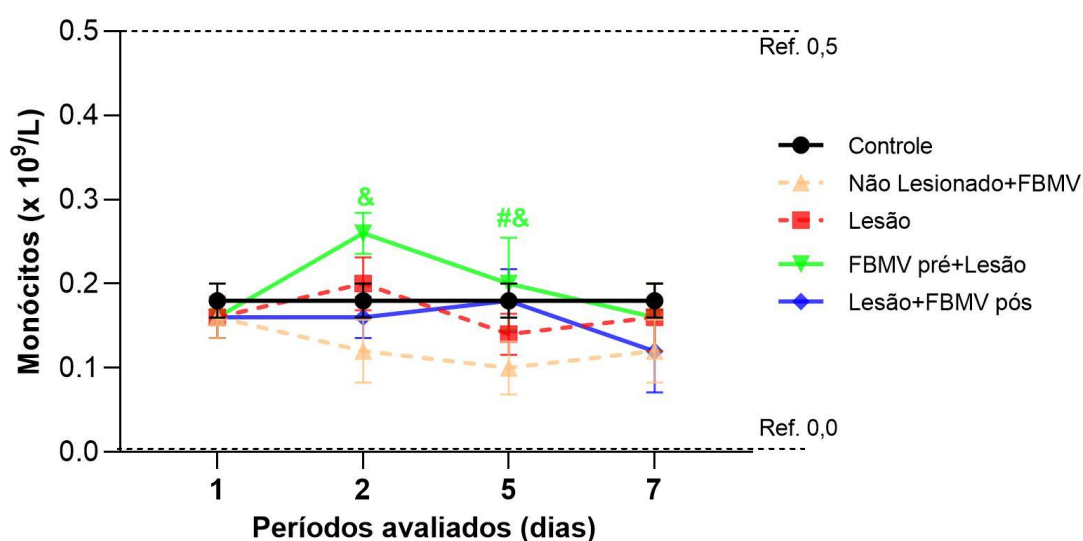


Figura 9. Análise dos monócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores absolutos e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). & $p<0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p<0,05$ vs. Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

Referente a análise relativa dos monócitos (Fig. 10), no dia 2 o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou aumento dos monócitos circulantes em relação ao grupo Não Lesionado + FBMV ($p=0,006$). No dia 5, o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou diferença em comparação aos grupos Lesão ($p=0,03$) e Não Lesionado + FBMV ($p=0,007$). Os resultados dos monócitos de forma relativa

não demonstraram diferença estatística entre os grupos quando avaliados nos dias 1 e 7 após a lesão.

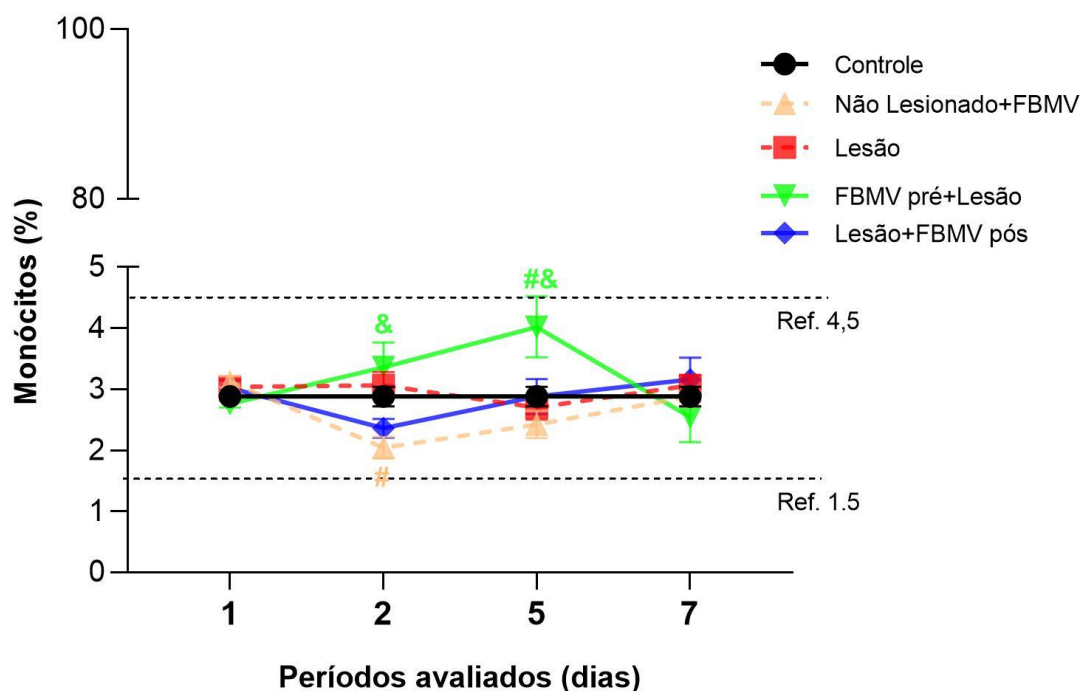


Figura 10. Análise dos monócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores relativo e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p < 0,05$ vs. Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

4.1.4 Granulócitos

Os valores de referência respectivos para os granulócitos estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas. Para a contagem absoluta (Fig. 11) e relativa (Fig. 12) foram determinados os valores mínimos de $0,4 \times 10^9/L$ e 7,3% e máximo de $3,2 \times 10^9/L$ e 30,1%, respectivamente.

No dia 1, os grupos lesionados tratados apresentaram aumento do valor relativo de granulócitos (Fig. 11) em comparação ao grupo Lesão (Lesão vs. FBMV prévio + Lesão, $p=0,02$; Lesão vs. Lesão + FBMV pós, $p=0,04$). No dia 2 após a lesão, o grupo Não Lesionado + FBMV apresentou redução granulocitária em comparação aos grupos Lesão ($p=0,002$) e FBMV pré+ FBMV ($p=0,04$).

No dia 5, o grupo Lesão apresentou aumento em comparação aos grupos Controle ($p<0,001$) e tratados (Não Lesionado + FBMV, $p=0,003$; FBMV pré+ Lesão, $p<0,001$; Lesão + FBMV pós, $p<0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos no dia 7.

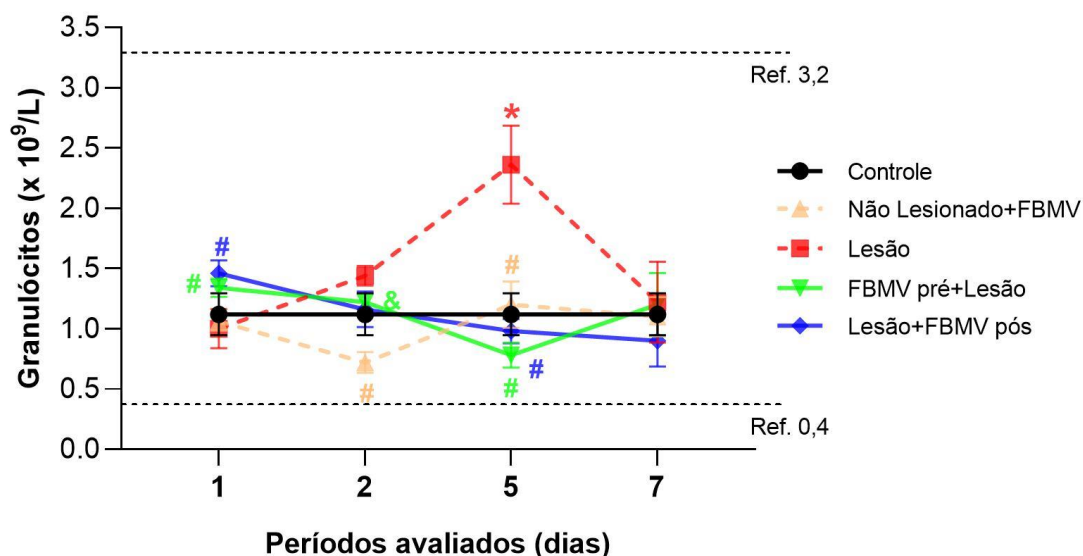


Figura 11. Análise dos granulócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores absoluto e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p<0,05$ vs. Controle, & $p<0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p<0,05$ vs. Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

Em relação aos dados relativos da composição periférica granulocitária (Fig. 12), no dia 1 o grupo FBMV pré+Lesão apresentou aumento em comparação aos grupos Controle ($p=0,04$) e Não Lesionado + FBMV ($p=0,03$).

Nos dias 2 e 5 após a indução da criolesão, o grupo Lesão apresentou aumento do percentual dos granulócitos em comparação aos demais grupos Controle ($p<0,001$ e $p=0,02$, respectivamente na ordem cronológica dos dias citados), ao grupo Não Lesionado + FBMV ($p<0,001$ e $p=0,002$, respectivamente aos dias 2 e 5) e aos grupos lesionados e tratados nos diferentes momentos (FBMV pré+ Lesão, $p=0,002$ e $p<0,001$; Lesão + FBMV pós, $p<0,001$ e $p=0,001$; respectivamente aos dias 2 e 5). Os grupos tratados não apresentaram diferença entre eles. No dia 7, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais avaliados.

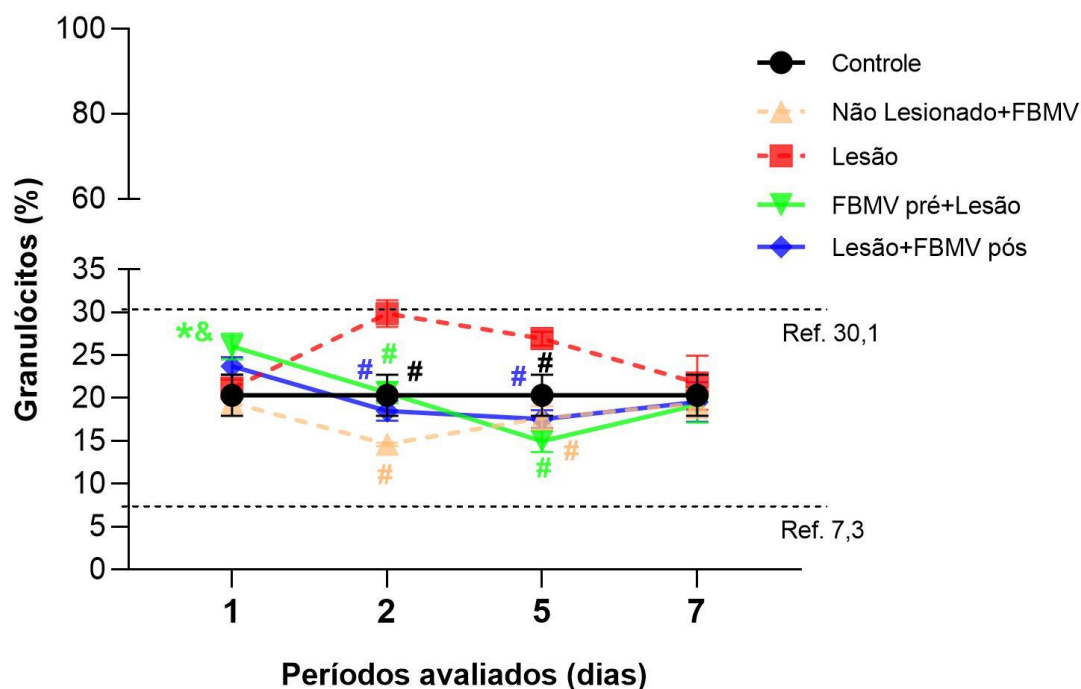


Figura 12. Análise dos granulócitos presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentados em valores relativo e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p < 0,05$ vs. Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

4.2 Análise hematológica eritrocitária

4.2.1 Eritrócitos

Os valores de referência respectivos para os eritrócitos (Fig. 10) estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas. Foram determinados os valores mínimos de $5,60 \times 10^{12}/L$ máximo de $7,89 \times 10^{12}/L$.

No dia 1 o grupo Lesão apresentou redução na contagem de eritrócitos em relação ao grupo Controle ($p=0,02$) e Não Lesionado + FBMV ($P=0,004$). Em relação aos grupos lesionados e tratados, o grupo Lesão + FBMV pós apresentou redução eritrocitária em comparação aos grupos Não Lesionado + FBMV ($p=0,01$) e Controle ($p=0,02$) no dia 1 e redução em relação ao grupo Controle ($p=0,05$) e FBMV pré+ Lesão ($p=0,02$) no dia 2.

Além disso os grupos Não Lesionado + FBMV e FBMV pré+ Lesão apresentaram semelhança ou aumento em relação ao valor de referência máximo nos dias 1, 2 e 7, assim como o grupo Controle. Os resultados referentes a contagem total dos eritrócitos não demonstraram diferença estatística entre os grupos quando avaliado no dia 5 e 7 após a lesão.

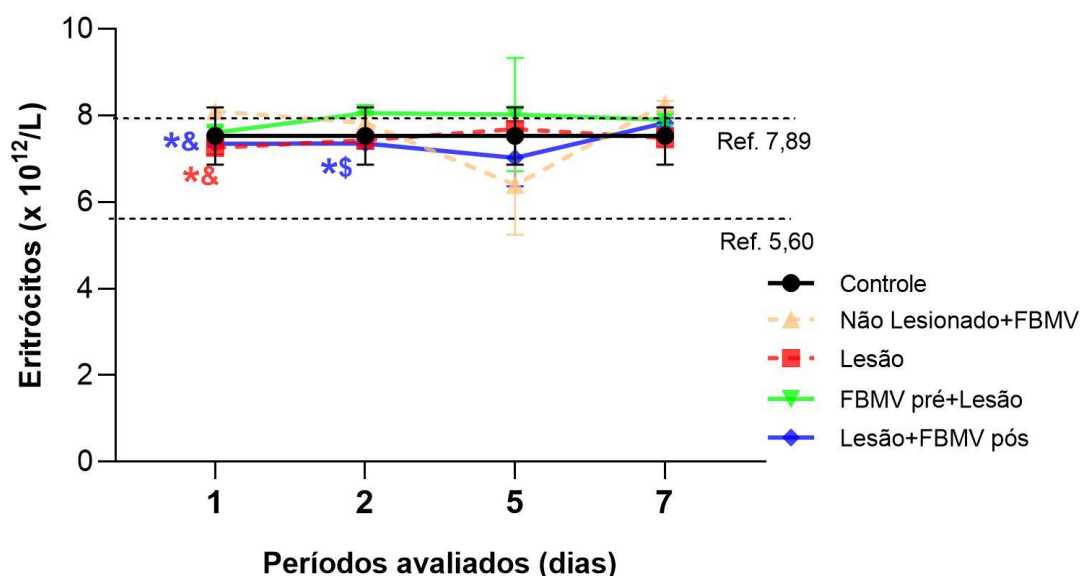


Figura 13. Análise dos eritrócitos ($\times 10^{12}/L$) presentes no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, \$ $p < 0,05$ vs. FBMV pré+Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

Os valores de referência respectivos para volume corpuscular médio (Fig. 14) e o coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos eritrócitos (Fig. 15) estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas, sendo os valores determinados mínimos de 53,0 fL e 11% e máximo de 68,8 fL e 15%, respectivamente.

No dia 1 após a lesão, os grupos lesionados e tratados ou não apresentaram aumento no volume corpuscular médio dos eritrócitos em comparação ao grupo Controle (Lesão, $p < 0,001$; FBMV pré+ Lesão, $p < 0,001$; Lesão + FBMV pós, $p = 0,004$). Além disso, o grupo Não Lesionado + FBMV apresentou redução em relação aos grupos Lesão ($p = 0,001$) e FBMV pré+ Lesão ($p < 0,001$). No Dia 2, o grupo Lesão + FBMV pós apresentou aumento em comparação aos grupos Controle ($p < 0,001$), Não Lesionado + FBMV ($p = 0,004$) e FBMV pré + Lesão ($p < 0,001$). Já no dia 5, o grupo FBMV pré + Lesão

apresentou aumento em relação ao Controle ($p=0,008$) e Lesão + FBMV pós ($p=0,03$). Não houve diferença significativa no dia 7.

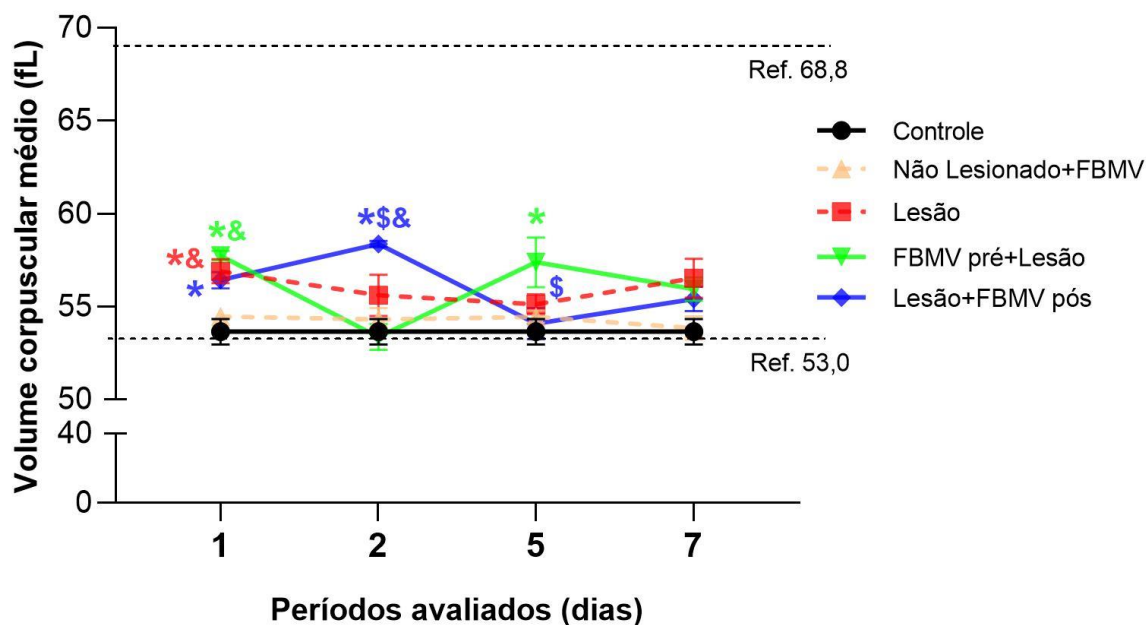


Figura 14. Análise do volume corpuscular médio do sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p<0,05$ vs. Controle, & $p<0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p<0,05$ vs. Lesão, \$ $p<0,05$ vs. FBMV pré+Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

Em relação ao coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos eritrócitos (Fig. 15), no dia 1 os grupos Lesão e FBMV pré+ Lesão apresentaram redução em comparação ao grupo Controle ($p=0,02$ e $p=0,004$, respectivamente). Já em relação aos grupos tratados, o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou redução em relação ao grupo Não Lesionado + FBMV ($p=0,02$).

Os grupos avaliados não apresentaram diferença estatística nos dias 2, 5 e 7. Em adição, os grupos experimentais apresentaram resultados semelhantes ou ainda menores em relação ao valor de referência mínimo em todos os períodos avaliados.

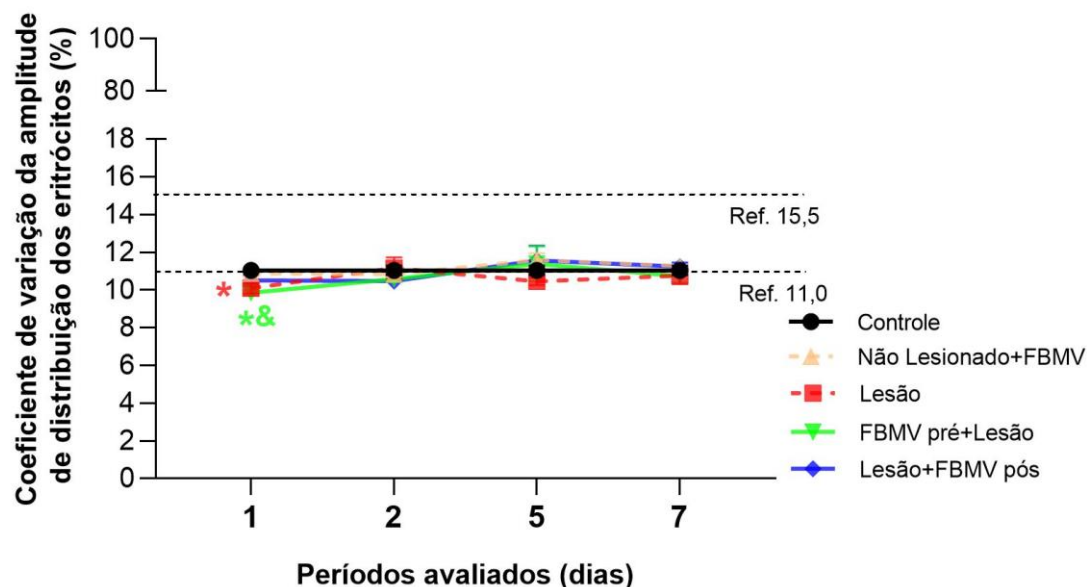


Figura 15. Análise do coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos eritrócitos do sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

4.2.2 Concentração da Hemoglobina

Os valores de referência para hemoglobina estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas, sendo os valores determinados mínimos de 12,0 g/dL e máximo de 15,0 g/dL.

Quanto a concentração de hemoglobina (Fig. 16), não houve diferença entre os grupos no dia 1. No dia 2, o grupo Lesão apresentou redução em comparação aos grupos não lesionados, sendo o Controle ($p=0,02$) e Não Lesionado + FBMV ($p=0,04$). Nos dias 5 e 7, os resultados não apresentaram diferença significativa entre os grupos avaliados.

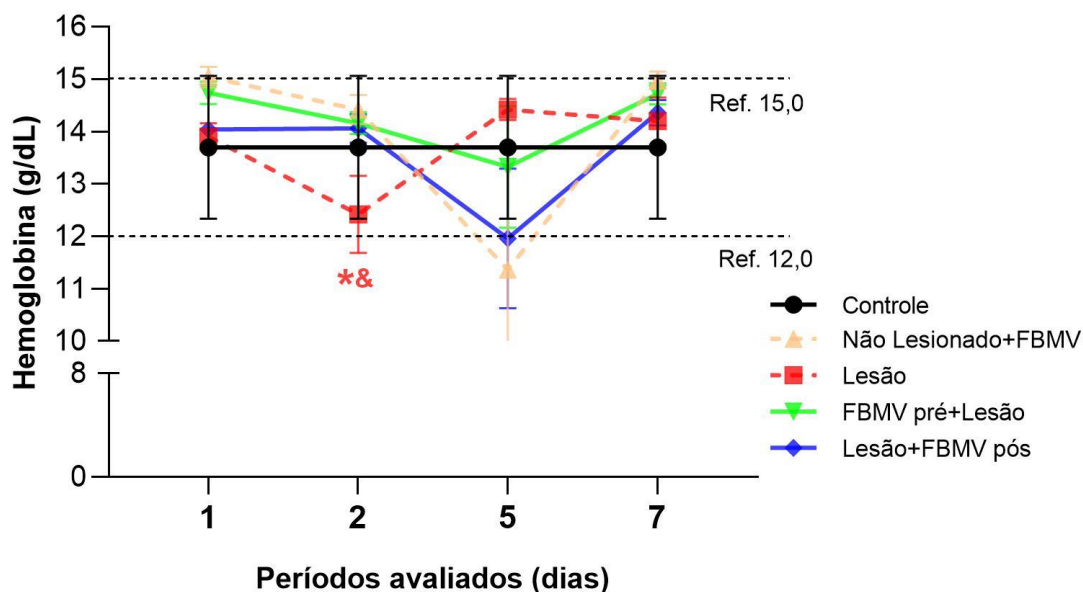


Figura 16. Análise da hemoglobina (g/dL) presente no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

Os valores de referência respectivos para concentração média de hemoglobina celular (Fig. 17) e hemoglobina corpuscular média (Fig. 18) estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas, sendo os valores determinados mínimos de 30,0 g/dL e 16 pg e máximo de 34,1 g/dL e 23,1 pg, respectivamente.

Em relação a concentração média de hemoglobina celular os grupos não apresentaram diferença estatística entre eles nos dias 1, 5 e 7. No dia 2, o grupo Lesão apresentou redução em relação aos grupos não lesionados e tratados ou não, sendo o grupo Controle ($p = 0,02$) e Não Lesionado + FBMV ($p = 0,04$).

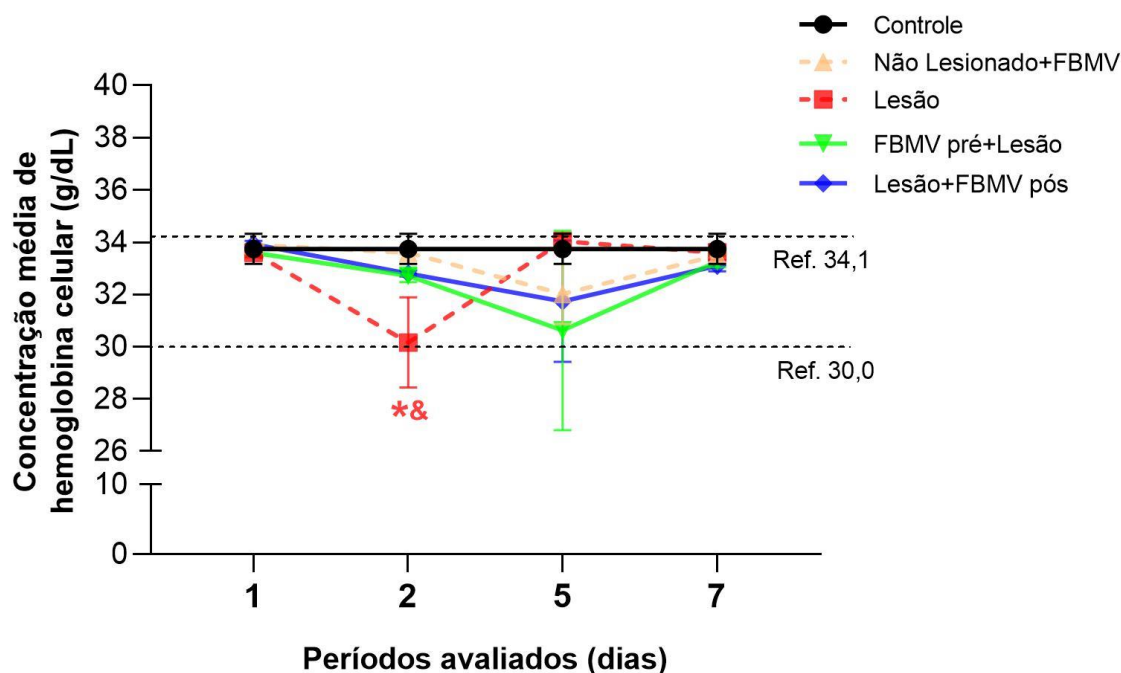


Figura 17. Análise da concentração média de hemoglobina celular no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

No dia 1, os grupos lesionados e tratados ou não apresentaram aumento na massa da hemoglobina corpuscular média (Fig. 18) em comparação ao grupo Controle, sendo Lesão ($p=0,005$), FBMV pré+ Lesão ($p=0,001$) e Lesão + FBMV pós ($p=0,006$). No dia 2, somente o grupo Lesão + FBMV pós apresentou aumento da hemoglobina corpuscular média em relação ao grupo Lesão ($p=0,002$). Os resultados referentes a hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferença estatística entre os grupos quando avaliado nos dias 5 e 7 após a lesão.

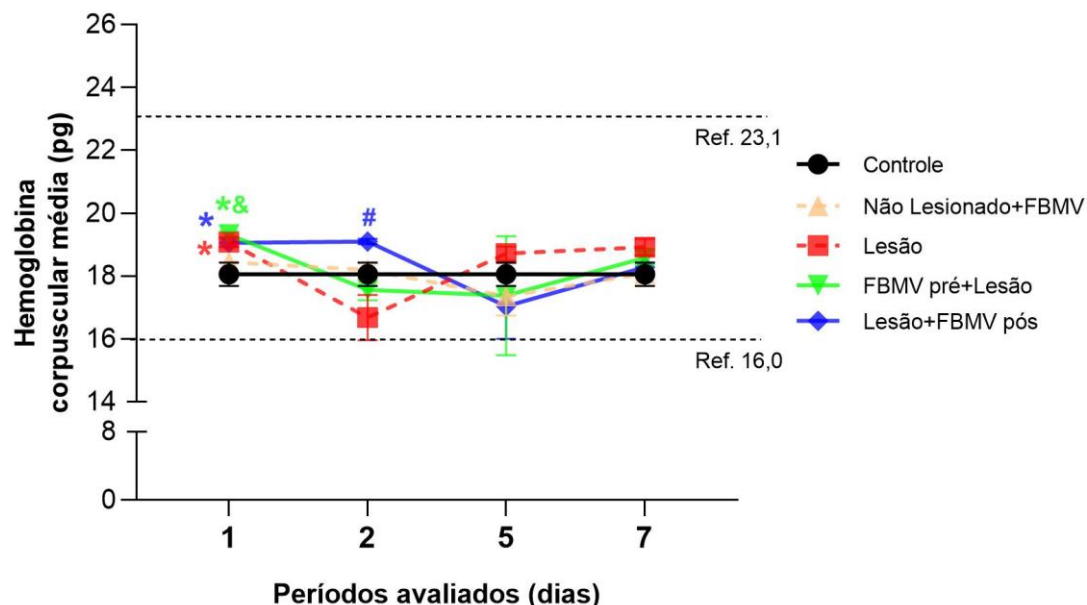


Figura 18. Análise hemoglobina corpuscular média no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p < 0,05$ vs. Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

4.3 Análise hematológica plaquetária

4.3.1 Plaquetas

Os resultados referentes a concentração de plaquetas (Fig. 19) não evidenciaram diferença estatística entre os grupos nos dias 1, 2 e 7 após a lesão. Porém, no dia 5 o grupo Lesão + FBMV pós apresentou redução em comparação ao grupo Não Lesionado + FBMV ($p = 0,04$). Os demais grupos não apresentaram diferença entre eles.

Os valores de referência para as plaquetas estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas, sendo os valores determinados mínimos de $100,0 \times 10^9/L$ e máximo de $1610,0 \times 10^9/L$.

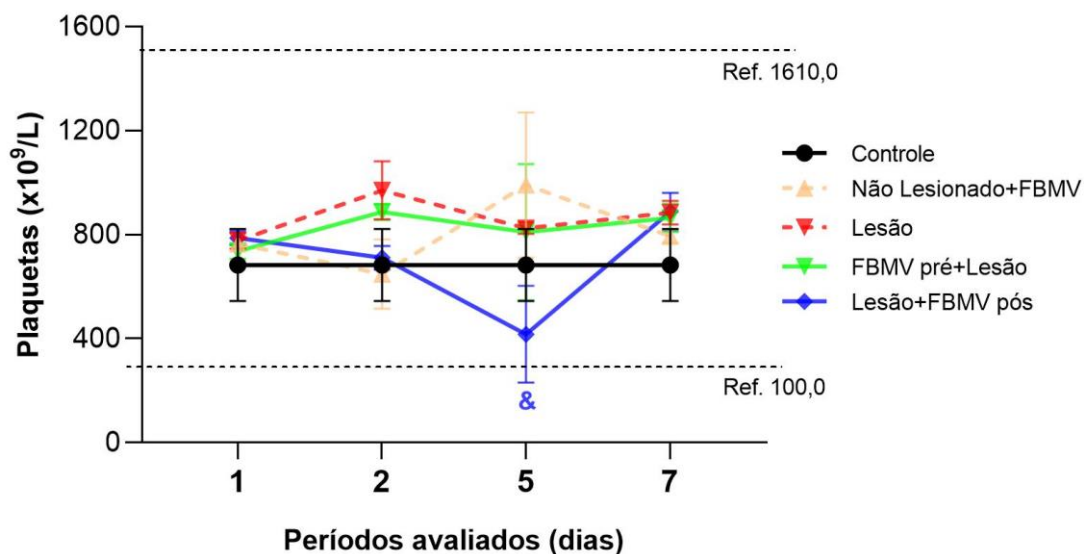


Figura 19. Análise de plaquetas no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV. FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

Os resultados referentes ao volume plaquetário médio (Fig. 20) não apresentaram diferença estatística entre os grupos e períodos avaliados. Em relação aos valores de referência, estão apresentados nos gráficos com as linhas verticais tracejadas, sendo os valores determinados mínimo de 3,8 fL e máximo de 6,2 fL. Foi possível observar que os grupos Lesão no dia 2 e FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós no dia 5 apresentaram resultados superiores ao valor de referência máximo.

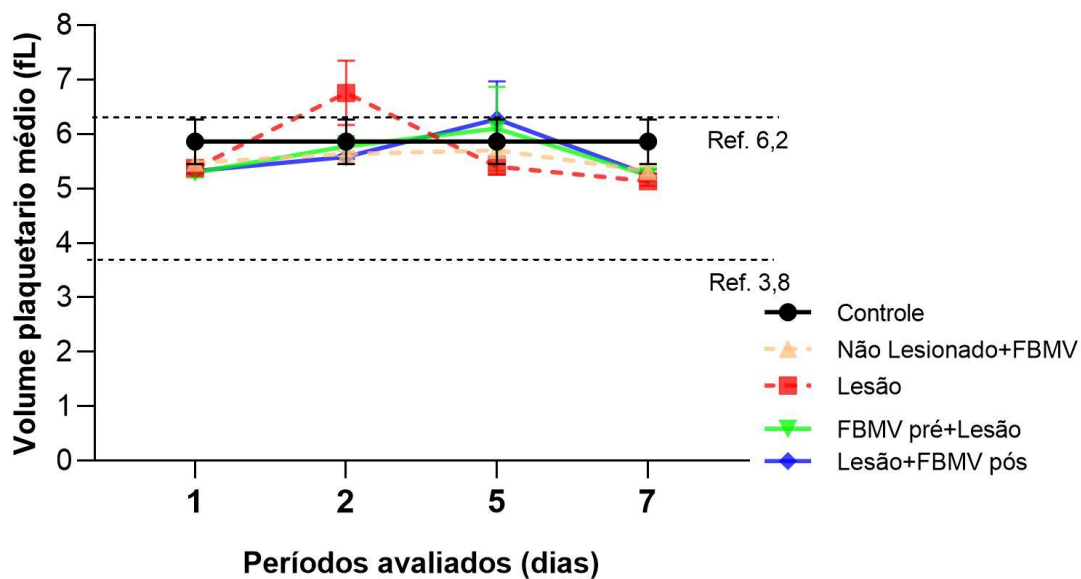


Figura 20. Análise do volume plaquetário médio no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

Os resultados referentes a amplitude de distribuição de plaquetas (Fig. 21) e plaquetócrito (Fig. 22) não apresentaram diferença estatística entre os grupos e períodos avaliados. Além de que esses parâmetros avaliados não apresentam valores de referência fornecidos pelo equipamento utilizado para a análise.

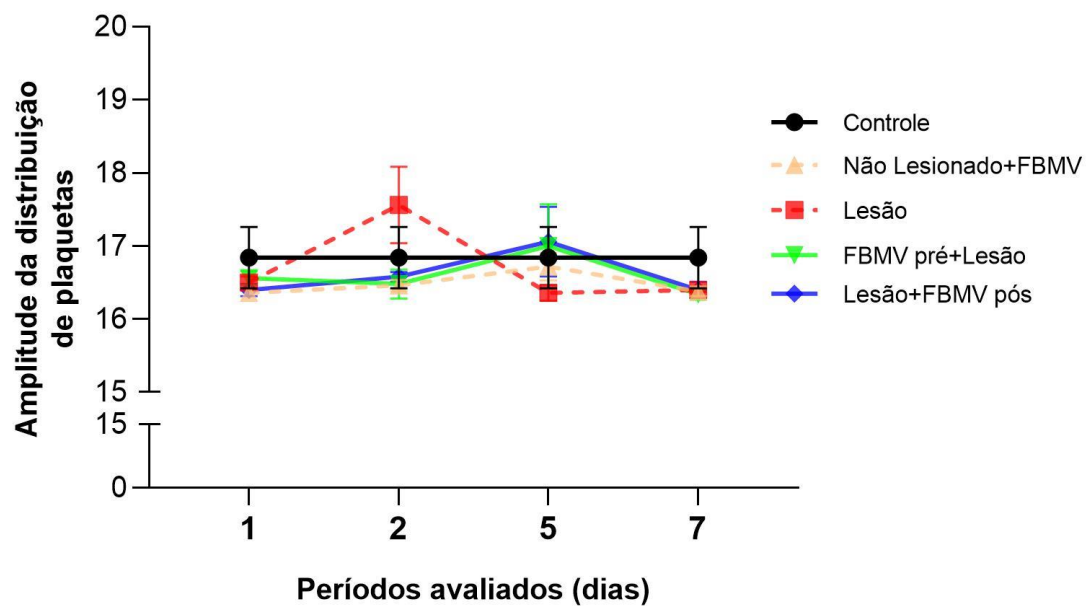


Figura 21. Análise da amplitude de distribuição de plaquetas no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

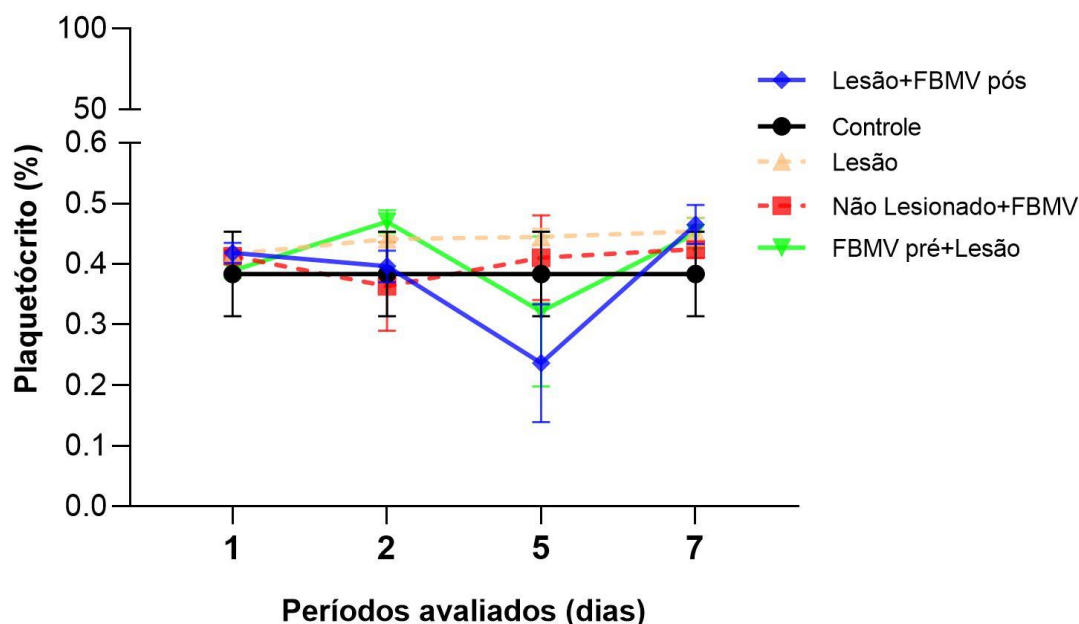


Figura 22. Análise plaquetócrito no sangue periférico dos grupos Controle, Não lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós e avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular; Ref., valor de referência mínimo e máximo indicado ao parâmetro analisado.

4.4 Expressão proteica por ELISA

4.4.1 Análise da produção de TNF- α

A análise proteica de TNF- α (Figura 23) evidenciou que no dia 1 o grupo Lesão + FBMV pós apresentou aumento na concentração desta citocina em relação aos demais grupos, Controle ($p = 0,034$), Não Lesionado + FBMV ($p = 0,049$) e FBMV pré+ Lesão ($p = 0,034$). Os demais grupos não apresentaram diferença entre si neste período. No dia 2, ambos os grupos lesionados e tratados (FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós) apresentaram aumento da produção de TNF- α quando comparado ao grupo Controle ($p = 0,030$; $p < 0,0001$). Porém, apenas o grupo Lesão + FBMV pós apresentou maior produção em comparação aos grupos Lesão ($p < 0,0001$), Não Lesionado + FBMV ($p < 0,0001$) e FBMV pré+ Lesão ($p = 0,0001$).

Após 5 dias somente o grupo Lesão + FBMV pós continuou a apresentar maiores níveis de TNF- α em comparação ao Controle ($p = 0,0004$), Lesão ($p = 0,003$), Não Lesionado + FBMV ($p = 0,0006$) e FBMV pré+ Lesão ($p = 0,002$).

Por fim, após 7 dias não foi verificada diferença nos níveis de TNF- α não entre os grupos experimentais avaliados.

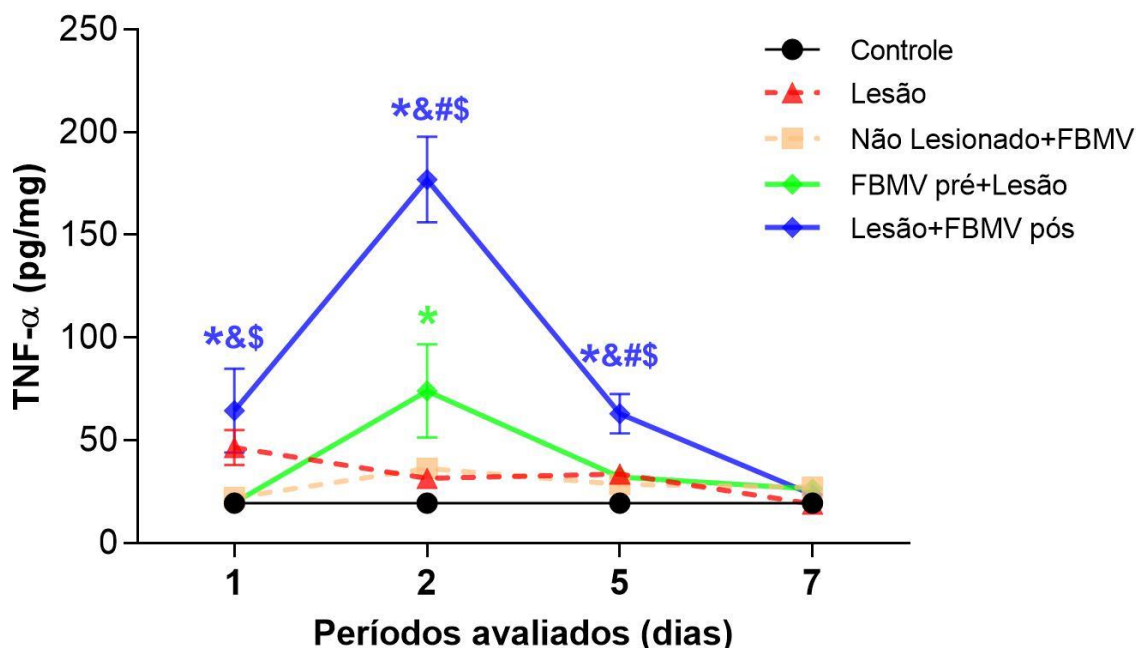


Figura 23. Análise da produção proteica de TNF- α avaliados nos grupos Controle, Não Lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p < 0,05$ vs. Lesão, \$ $p < 0,05$ vs. FBMV pré+Lesão. FBMV, fotobiomodulação vascular.

4.4.2 Análise da produção de MCP-1

Os resultados da análise proteica de MCP-1 (Figura 24) demonstraram que no período de 1 dia, o grupo Lesão apresentou aumento em seus níveis em comparação aos grupos Controle ($p = 0,0003$), ao grupo Não Lesionado + FBMV ($p = 0,005$). Dentre os grupos lesionados e tratados, o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou aumento da síntese de MCP-1 em relação aos grupos Controle ($p = 0,006$) e Não Lesionado + FBMV ($p = 0,008$). Já o grupo Lesão + FBMV pós apresentou aumento em relação aos grupos Controle ($p < 0,0001$), Não Lesionado + FBMV ($p < 0,0001$), Lesão ($p = 0,036$) e FBMV pré+ Lesão ($p = 0,023$).

No dia 2, o grupo Lesão apresentou maior produção de MCP-1 em comparação ao grupo Controle ($p < 0,0001$), Não Lesionado + FBMV ($p <$

0,0001). Já o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou aumento de MCP-1 em comparação aos grupos Controle ($p < 0,0001$) e Não Lesionado + FBMV ($p < 0,0001$). O grupo Lesão + FBMV pós não apresentou diferença entre os grupos Controle e Não-Lesionado + FBMV, porém apresentou redução da produção de MCP-1 em relação ao grupo Lesão ($p = 0,01$). Os grupos lesionados e tratados apresentaram diferença entre eles, sendo a maior produção pelo grupo FBMV pré + Lesão em relação ao Lesão + FBMV pós ($p = 0,0002$).

No dia 5 houve maior expressão proteica de MCP-1 no grupo Lesão + FBMV em comparação aos grupos Controle ($p < 0,0001$), Não Lesionado + FBMV ($p = 0,0002$) e Lesão ($p = 0,019$). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados (FBMV).

Já no dia 7, a expressão de MCP-1 foi baixa em todos os grupos experimentais sendo estatisticamente maior no grupo Lesão em comparação aos demais grupos experimentais (Controle, $p < 0,0001$; Não Lesionado + FBMV, $p = 0,0002$; FBMV pré+ Lesão, $p = 0,014$; Lesão + FBMV pós, $p < 0,0001$). Os grupos lesionados e tratados não apresentaram diferença entre si.

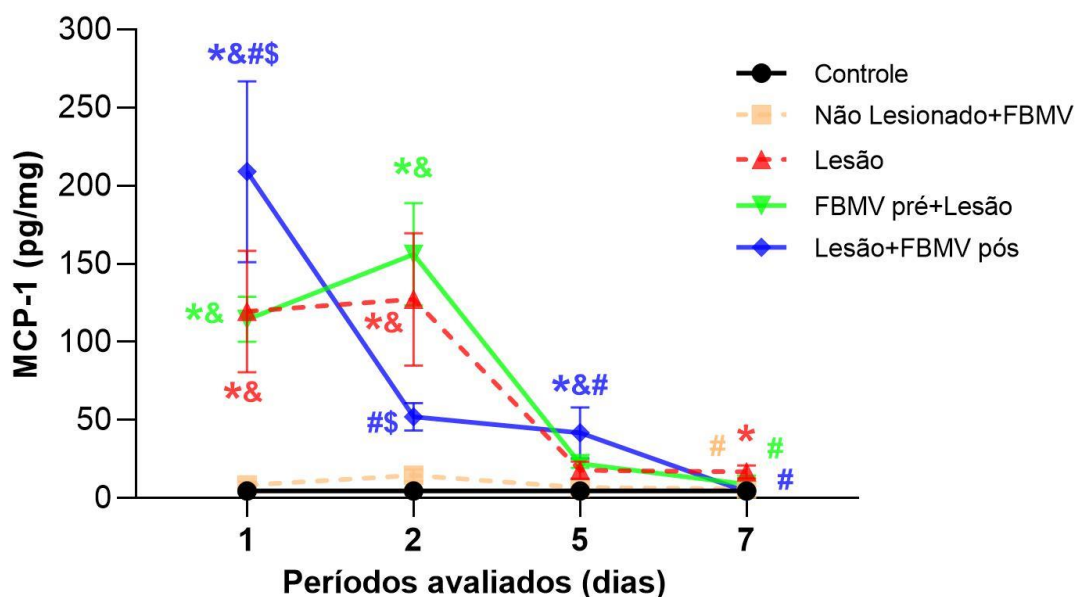


Figura 24. Análise da produção proteica de MCP-1 avaliada nos grupos Controle, Não Lesionado + FBMV, Lesão, FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7). Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). * $p < 0,05$ vs. Controle, & $p < 0,05$ vs. Não Lesionado+FBMV, # $p < 0,05$ vs. Lesão, \$ $p < 0,05$ vs. FBMV pré+Lesão. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular.

4.5 Análise morfológica qualitativa e quantitativa por H&E

A figura 25 apresenta imagens representativas dos aspectos morfológicos de cada grupo e avaliado nos diferentes períodos experimentais em dias. O grupo controle (Figura 25A) apresentou os aspectos do tecido com morfologia normal, sem sinais de lesão ou células inflamatórias, com fibras poligonais apresentando múltiplos núcleos periféricos e discreta vascularização.

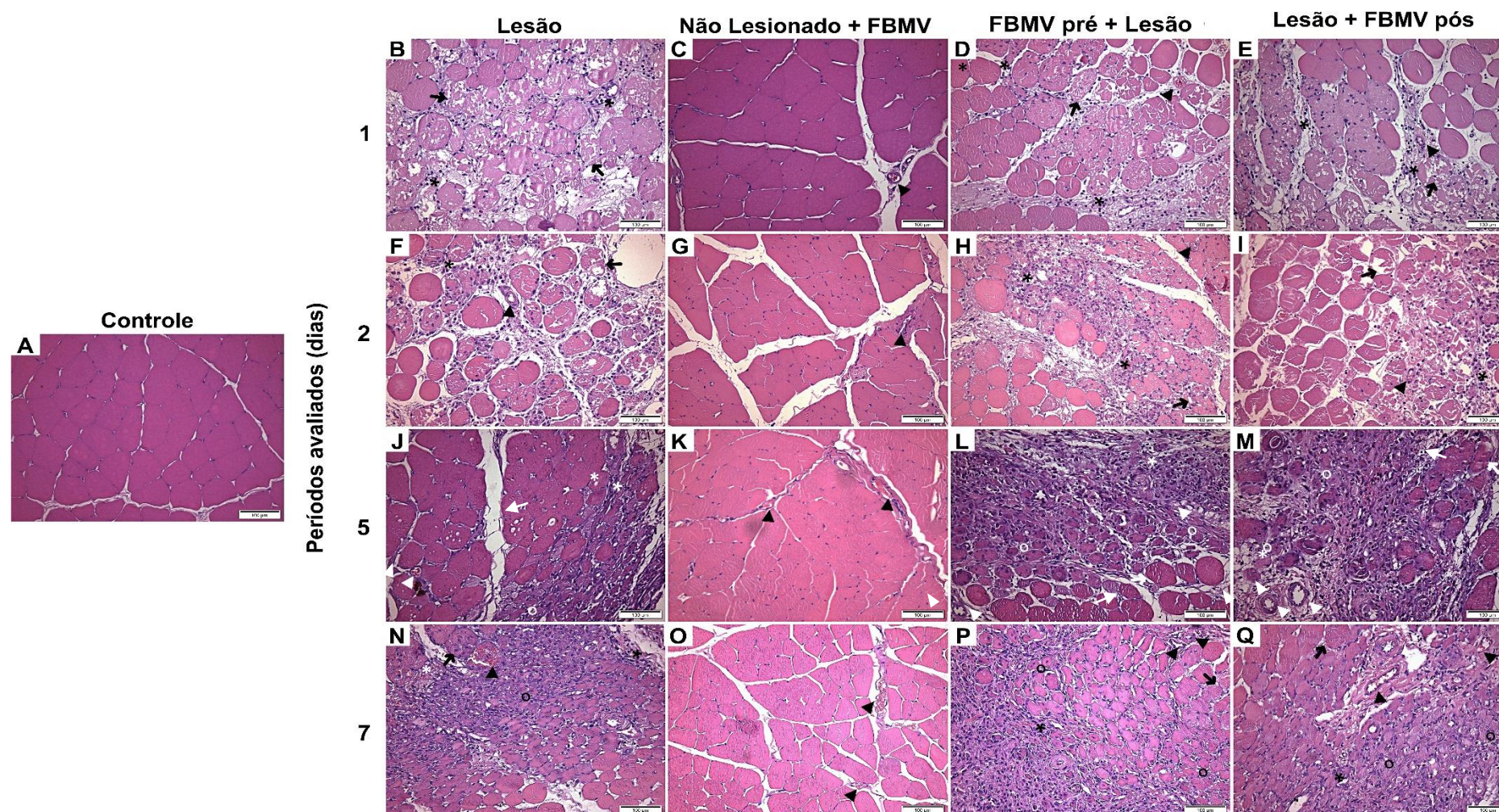


Figura 25. Avaliação morfológica dos cortes histológicos por eosina e hematoxilina (H&E). Imagens representativas de cada grupo e período experimental (magnificação: 200x). Indicação da presença de infiltrado inflamatório (*), mionecrose (seta), fibras novas e imaturas (círculo) e vasos sanguíneos (triângulo). FBMV, fotobiomodulação vascular.

4.5.1 Infiltrado inflamatório

O grupo controle não apresentou presença de infiltrado inflamatório no período avaliado (Figura 25A e Figura 26). Em relação ao grupo Não Lesionado + FBMV pré não foi possível observar células inflamatórias como esperado nos períodos avaliados (Figura 25C, G, K e O), assim este não foi demonstrado no gráfico por não ser quantificável. No dia 1, foram observados sinais do processo inflamatório agudo em todos os grupos submetidos a lesão (Figura 25B, D e E) apresentando maior intensidade no grupo Lesão, assim a análise quantitativa (Figura 24) permitiu verificar que o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou redução do infiltrado inflamatório em comparação ao grupo Lesão ($p < 0,001$). Na análise qualitativa do dia 2 os grupos lesionados, sendo tratados ou não, apresentaram semelhança na presença de células inflamatórias (Figura 25F, H e I). A quantificação do infiltrado nesse período não apresentou diferença estatística entre os grupos avaliados (Figura 26).

No dia 5, o grupo Lesão (Figura 25J) apresentou maior presença de células inflamatórias entre as fibras e os grupos tratados (FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós) apresentaram diminuição e, nesse aspecto, semelhança entre eles (Figura 25L e M). A análise quantitativa (Figura 26) corroborou a redução do infiltrado inflamatório no grupo FBMV pré+ Lesão em comparação ao grupo Lesão ($p = 0,04$) e os grupos tratados não apresentaram diferença estatística entre eles. Similarmente no dia 7 o grupo Lesão (Figura 25N) apresentou maior presença de infiltrado em comparação aos grupos FBMV pré+ Lesão (Figura 25P), porém todos os grupos lesionados apresentaram redução em relação aos períodos de avaliação anteriores. A avaliação quantitativa (Figura 26) permitiu corroborar que houve redução do grupo FBMV pré+ Lesão em comparação ao grupo Lesão ($p = 0,003$). Não houve diferença estatística nesse período entre os grupos tratados.

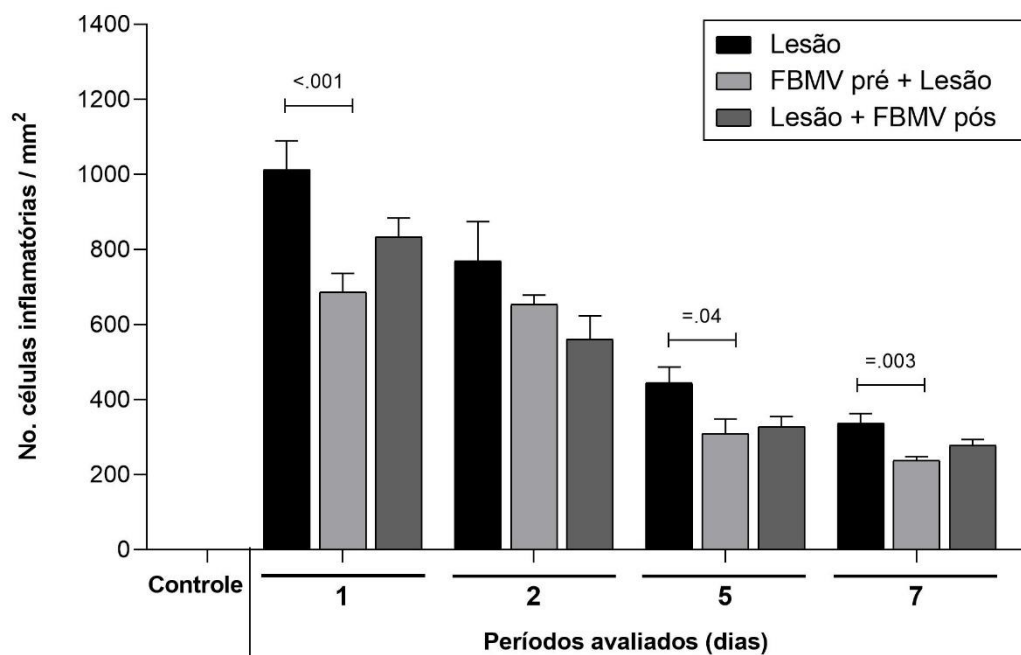


Figura 26. Análise quantitativa do número de células inflamatórias/mm² avaliados nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular.

4.5.2 Mionecrose

Na análise morfológica qualitativa e quantitativa o grupo controle não apresentou sinais de mionecrose (Figuras 25A e 27). O grupo Não Lesionado + FBMV apresentou aspecto histológico normal em todos os períodos avaliados (Figura 25C, G, K e O), sem presença de mionecrose, assim o grupo não foi demonstrado no gráfico para avaliação quantitativa (Figura 27).

Nos dias 1 e 2 após a lesão os grupos lesionados, independentes se tratados ou não, apresentaram grande quantidade de fibras com aspectos de mionecrose quando avaliados de forma qualitativa. Porém, os grupos tratados (Figuras 25D, E, H e I) apresentaram menor quantidade de mionecrose em comparação ao grupo apenas lesionado (Lesão; Figuras 25B e F). Assim, implicando na análise quantitativa (Figura 27) os grupos FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós demonstraram redução de mionecrose em relação ao grupo Lesão no dia 1 ($p < 0,001$, ambos) e no dia 2 ($p < 0,001$; $p = 0,01$; respectivamente). Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística entre eles nos dias 1 e 2.

No dia 5 foi possível notar importante redução de mionecrose nos grupos lesionados, sendo a presença ainda mais evidente no grupo Lesão (Figura 25J). A análise quantitativa (Figura 27) permitiu verificar que apenas o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou redução de mionecrose em comparação ao grupo Lesão ($p = 0,03$). Não houve diferença entre os grupos que foram tratados.

No dia 7 os grupos lesionados (Figuras 25N, P e Q) apresentaram, de forma qualitativa, leve presença de mionecrose. Sendo que, os grupos tratados Figuras 25P e Q) demonstraram redução com maior evidência. A análise quantitativa comprovou que os grupos FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós apresentaram redução em comparação ao grupo Lesão ($p < 0,001$, ambos). Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística entre si.

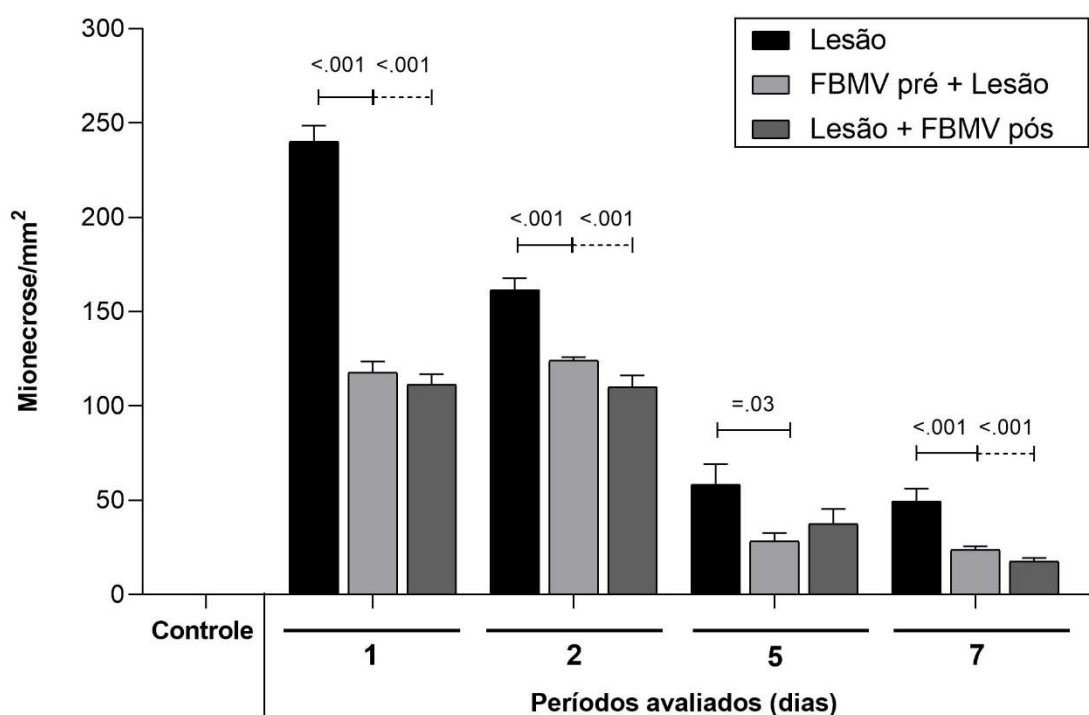


Figura 27. Análise quantitativa de mionecrose/mm² avaliados nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular.

4.5.3 Vasos sanguíneos

Na análise morfológica qualitativa e quantitativa o grupo Controle apresentou leve presença de vasos sanguíneos (Figuras 25A e 28). Na análise qualitativa após 1 e 2 dias, de forma semelhante, os grupos tratados (FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós) apresentaram discreto aumento da presença de vasos sanguíneos em comparação ao grupo apenas Lesão (Figuras 25B, D-F, H e I). Os grupos Lesão e Não Lesionado + FBMV apresentaram pouca vascularização e semelhança entre os eles e ao grupo Controle nos períodos de 1 e 2 dias. De forma quantitativa (Figura 28), os grupos FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós apresentaram aumento da presença de vasos sanguíneos em relação aos grupos Lesão ($p < 0,001$, ambos) e Não Lesionado + FBMV ($p < 0,001$, ambos). Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística entre eles nesses períodos avaliados.

No dia 5 (Figura 25J-M), todos os grupos avaliados apresentaram aumento de vasos sanguíneos sendo que o grupo FBMV pré+ Lesão apresentou intensa vascularização em comparação aos demais. Referente ao aspecto quantitativo (Figura 28), o grupo FBMV pré+ Lesão permitiu verificar o aumento em comparação aos grupos Lesão ($p = 0,04$) e Não Lesionado + FBMV ($p = 0,008$). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados.

Na análise histológica qualitativa do dia 7 (Figura 25N-Q), todos os grupos avaliados apresentaram presença de vasos sanguíneos, porém com maior intensidade apresentada pelo grupo FBMV pré+ Lesão (Figura 25P). A análise quantitativa (Figura 28) demonstra o aumento de vasos sanguíneos no grupo FBMV pré+ Lesão em relação aos grupos Lesão ($p < 0,001$), Não Lesionado + FBMV ($p < 0,001$). Já a relação dos grupos tratados, o Lesão + FBMV pós apresentou redução em comparação ao FBMV pré+ Lesão ($p < 0,001$). Além disso, o grupo Não Lesionado + FBMV apresentou redução em comparação aos grupos Lesão ($p = 0,04$) e Lesão + FBMV pós ($p = 0,002$).

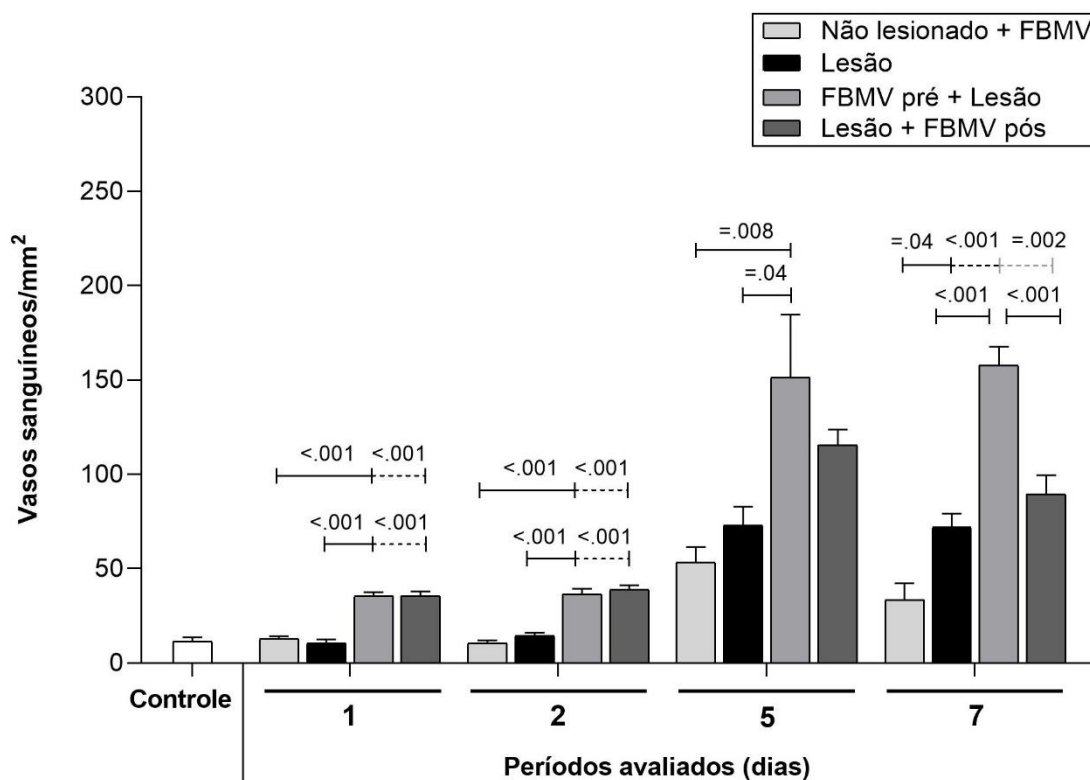


Figura 28. Análise quantitativa de vasos sanguíneos/mm² avaliados nos grupos Controle, Lesão, Não Lesionado + FBMV, FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular.

4.5.4 Fibras novas e imaturas

Na análise histológica qualitativa e quantitativa o grupo Controle apresentou leve presença de fibras novas e imaturas (Figuras 25A e 29). Nos dias 1 e 2 após a lesão, os aspectos qualitativos e quantitativos não demonstraram presença de fibras novas e imaturas nos grupos avaliados (Figuras 25B-I e 29).

Na análise histológica qualitativa do dia 5 e 7 (Figura 25J-Q), os grupos Lesão apresentaram moderada presença e os tratados (FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós) intensa presença de fibras novas e imaturas. Possibilitando também a percepção de que os grupos tratados apresentaram melhor organização tecidual. O grupo Não Lesionado + FBMV, apresentou, como esperado, leve presença de fibras novas e imaturas em ambos os períodos.

No dia 5, a análise quantitativa (Figura 29) permitiu verificar que os grupos tratados apresentaram aumento de fibras novas e imaturas em relação aos grupos Lesão (vs. FBMV pré+ Lesão, $p < 0,001$; vs. Lesão + FBMV pós, $p = 0,001$) e Não Lesionado + FBMV ($p < 0,001$, ambos). Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística entre eles.

No dia 7, a análise quantitativa (Figura 29) permitiu verificar o aumento da presença de fibras novas e imaturas do grupo FBMV pré+ Lesão em relação aos grupos Lesão ($p = 0,03$) e Não Lesionado + FBMV ($p < 0,001$). Já o grupo Lesão + FBMV pós apresentou aumento somente em comparação ao grupo Não Lesionado + FBMV ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados.

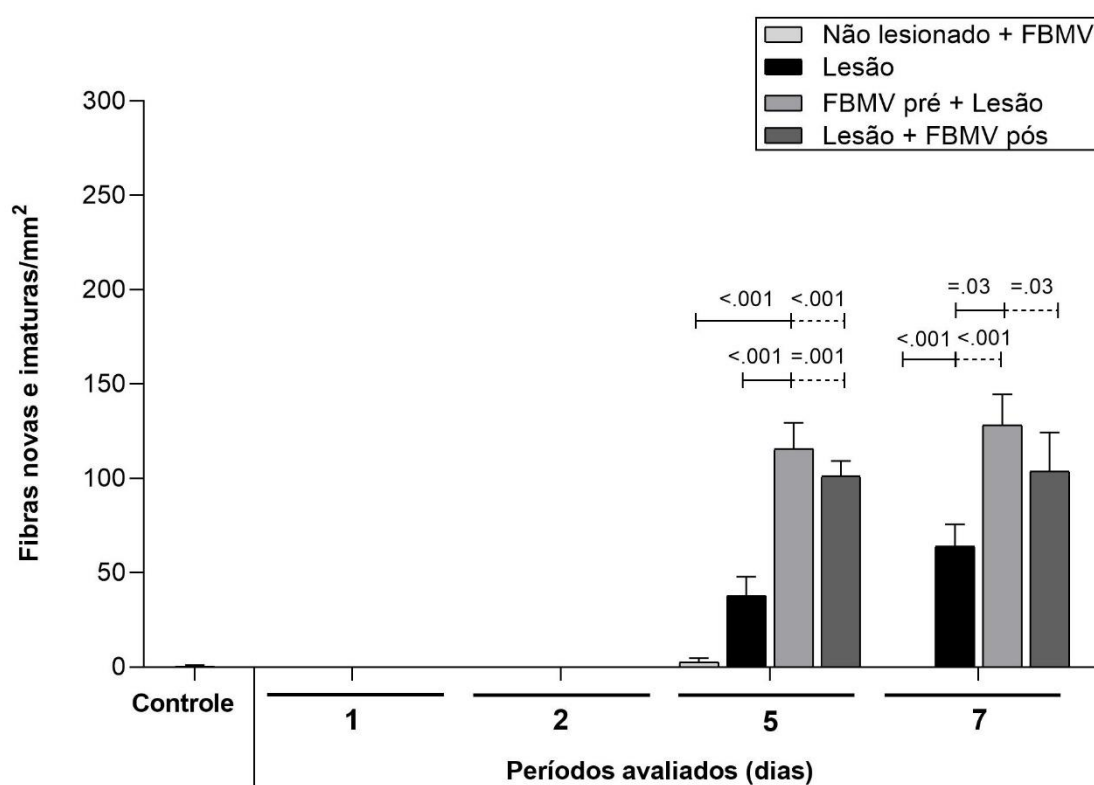


Figura 29. Análise quantitativa de fibras novas e imaturas/mm² avaliados nos grupos Controle, Lesão, FBMV pré+ Lesão e Lesão + FBMV pós avaliados nos dias 1, 2, 5 e 7. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). FBMV, fotobiomodulação vascular.

4.6 Quadros resumos dos resultados

Quadro 1. Resumo dos resultados referentes a análise quantitativa hematológica de leucócitos totais e diferenciais

	Valor absoluto				Valor relativo		
	Leucócitos	Granulócitos	Monócitos	Linfócitos	Granulócitos	Monócitos	Linfócitos
Controle	1 - ↓ 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↑
X	5 - ↓	5 - ↑	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
Não lesionado + FBMV	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Controle	1 - ↓ 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↑	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↓
X	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ↑	5 - ns	5 - ns
Lesão	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Controle	1 - ns 2 - ↑	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ↑ 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns
X	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
FBMV pré + Lesão	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Controle	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↓
X	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
Lesão + FBMV pós	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 -
Não lesionado + FBMV	1 - ↑ 2 - ↓	1 - ns 2 - ↑	1 - ns 2 - ↑	1 - ns 2 - ns	1 - ↑ 2 - ↓	1 - ns 2 - ↑	1 - ns 2 - ns
X	5 - ↑	5 - ns	5 - ↑	5 - ns	5 - ns	5 - ↑	5 - ns
FBMV pré + Lesão	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Não lesionado + FBMV	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↓	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns
X	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
Lesão + FBMV pós	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Lesão	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↓	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↓	1 - ns 2 - ↓	1 - ns 2 - ↑
X	5 - ↓	5 - ↓	5 - ns	5 - ns	5 - ↓	5 - ns	5 - ns
Não lesionado + FBMV	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Lesão	1 - ↑ 2 - ns	1 - ↑ 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↓	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↑
X	5 - ns	5 - ↓	5 - ↑	5 - ns	5 - ↓	5 - ↑	5 - ns
FBMV pré + Lesão	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Lesão	1 - ↑ 2 - ns	1 - ↑ 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↓	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↑
X	5 - ns	5 - ↓	5 - ns	5 - ns	5 - ↓	5 - ns	5 - ns
Lesão + FBMV pós	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
FBMV pré + Lesão	1 - ns 2 - ↓	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ↓	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns
X	5 - ↓	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
Lesão + FBMV pós	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns

↑, aumento; ↓, redução; ns, não significante.

Quadro 2. Resumo dos resultados referentes a análise hematológica de parâmetros eritrocitários e plaquetários

	Eritrócitos x 10 ¹² /L	VCM fL	ADVGVC %	HGB g/dL	CHCM g/dL	HCM pg	HCT %	PLT x 10 ⁹ /L	VPM fL	PDW	PCT %
Controle	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
Não lesionado + FBMV	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Controle	1 - ↓	1 - ↑	1 - ↓	1 - ns	1 - ns	1 - ↓	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ↓	2 - ↓	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
Lesão	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Controle	1 - ns	1 - ↑	1 - ↓	1 - ns	1 - ns	1 - ↑	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
FBMV pré + Lesão	5 - ns	5 - ↑	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Controle	1 - ↓	1 - ↑	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ↓	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ↓	2 - ↑	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
Lesão + FBMV pós	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Não lesionado + FBMV	1 - ns	1 - ↑	1 - ↓	1 - ns	1 - ns	1 - ↓	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
FBMV pré + Lesão	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Não lesionado + FBMV	1 - ↓	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ns	2 - ↑	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
Lesão + FBMV pós	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ↓	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Lesão	1 - ↓	1 - ↓	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ↑	2 - ↑	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
Não lesionado + FBMV	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Lesão	1 - ns	1 - ↑	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
FBMV pré + Lesão	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
Lesão	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ↑	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
Lesão + FBMV pós	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns
FBMV pré + Lesão	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns	1 - ns
X	2 - ↓	2 - ↑	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns	2 - ns
Lesão + FBMV pós	5 - ns	5 - ↑	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns

HGB, Hemoglobina; HCT, Hematócrito; VCM, Volume Corpuscular médio; HCM, Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; ADVGVC, coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; PLT, Plaquetas; VPM, Volume Plaquetar Médio; PDW, Amplitude da distribuição das plaquetas; PCT, Plaquetócrito. ↑, aumento; ↓, redução; ns, não significante.

Quadro 3. Resumo dos resultados referentes a análise de produção proteica e histológica

	Produção proteica			Histológico		
	TNF- α	MCP-1	Infiltrado inflamatório	Mionecrose	Vasos sanguíneos	Fibras novas e imaturas
Controle	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns				
X	5 - ns	5 - ns	—	—	—	—
Não lesionado + FBMV	7 - ns	7 - ns				
Controle	1 - ns 2 - ns	1 - \uparrow 2 - \uparrow				
X	5 - ns	5 - ns	—	—	—	—
Lesão	7 - ns	7 - \uparrow				
Controle	1 - ns 2 - \uparrow	1 - \uparrow 2 - \uparrow				
X	5 - ns	5 - ns	—	—	—	—
FBMV pré + Lesão	7 - ns	7 - ns				
Controle	1 - \uparrow 2 - \uparrow	1 - \uparrow 2 - ns				
X	5 - \uparrow	5 - \uparrow	—	—	—	—
Lesão + FBMV pós	7 - ns	7 - ns				
Não lesionado + FBMV	1 - ns 2 - ns	1 - \uparrow 2 - \uparrow			1 - \uparrow 2 - \uparrow	1 - ns 2 - ns
X	5 - ns	5 - ns	—	—	5 - \uparrow	5 - \uparrow
FBMV pré + Lesão	7 - ns	7 - ns			7 - \uparrow	7 - \uparrow
Não lesionado + FBMV	1 - \uparrow 2 - \uparrow	1 - \uparrow 2 - ns			1 - \uparrow 2 - \uparrow	1 - ns 2 - ns
X	5 - \uparrow	5 - \uparrow	—	—	5 - ns	5 - \uparrow
Lesão + FBMV pós	7 - ns	7 - ns			7 - \uparrow	7 - \uparrow
Lesão	1 - ns 2 - ns	1 - \downarrow 2 - \downarrow			1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns
X	5 - ns	5 - ns	—	—	5 - ns	5 - ns
Não lesionado + FBMV	7 - ns	7 - ns			7 - \downarrow	7 - \downarrow
Lesão	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - \downarrow 2 - ns	1 - \downarrow 2 - \downarrow	1 - \uparrow 2 - \uparrow	1 - ns 2 - ns
X	5 - ns	5 - ns	5 - \downarrow	5 - \downarrow	5 - \uparrow	5 - \uparrow
FBMV pré + Lesão	7 - ns	7 - \downarrow	7 - \downarrow	7 - \downarrow	7 - \uparrow	7 - \uparrow
Lesão	1 - ns 2 - \uparrow	1 - \uparrow 2 - \downarrow	1 - ns 2 - ns	1 - \downarrow 2 - \downarrow	1 - \uparrow 2 - \uparrow	1 - ns 2 - ns
X	5 - \uparrow	5 - \uparrow	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - \uparrow
Lesão + FBMV pós	7 - ns	7 - \downarrow	7 - ns	7 - \downarrow	7 - ns	7 - \uparrow
FBMV pré + Lesão	1 - \uparrow 2 - \uparrow	1 - \uparrow 2 - \downarrow	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns	1 - ns 2 - ns
X	5 - \uparrow	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns	5 - ns
Lesão + FBMV pós	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - ns	7 - \downarrow	7 - ns

\uparrow , aumento; \downarrow , redução; ns, não significativo.

5 Discussão

A alta incidência de lesões musculares em indivíduos sedentários e, principalmente, em atletas ocorre devido à alta demanda de treinamentos e competições, e estas podem acarretar a redução de performance e de desempenho, afastamento de atividades, além de representar um impacto negativo na qualidade de vida (Pfirrmann et al., 2016). Um estudo recente evidenciou que no Brasil há a prevalência de 47,8% de lesões musculares em atletas de 5 diferentes modalidades (Goes et al., 2020).

Assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de uma terapia que possa ser utilizada até mesmo antes da ocorrência de uma lesão muscular sem a necessidade de determinação do local de aplicação, que se refere a FBMV. Com esse intuito, foram utilizados parâmetros dosimétricos previamente avaliados em aplicações sobre o sítio da lesão, de forma a permitir a compreensão da irradiação não-invasiva do sangue em animais ainda saudáveis e a influência de seus efeitos sobre o reparo muscular após a lesão aguda. Além disso, também foram avaliados os efeitos da FBMV, *per se*, em organismo saudável (Não Lesionado + FBMV) de forma a permitir comparações com os grupos nos quais foram submetidos a perturbação da homeostase (Lesão + FBMV pré ou pós).

Em decorrência da necessidade de padronização da nomenclatura utilizada em referência a irradiação do sangue não-invasiva, de modo a compreender variados locais anatômicos e sendo aplicada de formas transcutânea ou transmucosa, o termo fotobiomodulação vascular (FBMV) foi recentemente recomendado (Fernandes et al., 2021) e empregado no presente estudo, assim como referido na revisão sistemática conduzida paralelamente (Apêndice A).

O processo de reparo muscular após as lesões depende de forma coordenada dos sinais intrínsecos do músculo estriado esquelético, que garantem sua plasticidade e alta capacidade de regeneração, bem como de sinais extrínsecos, atribuídos principalmente as células de defesa e aos produtos por elas secretados (Italiani and Boraschi, 2014; James G Tidball, 2017; Yang and Hu, 2018).

Considerando a composição do sangue, nossos resultados demonstraram que a FBMV foi capaz de modular os componentes celulares, além de moléculas em ambos os momentos de sua aplicação, o que pode interferir no processo de reparo muscular. Porém, há a necessidade do entendimento dos mecanismos de ação que são envolvidos na modulação sanguínea e seu acarretamento em efeitos sistêmicos.

Neste estudo, ambos os grupos lesionados e tratados, independente se de forma preventiva ou terapêutica (FBMV pré + Lesão ou Lesão + FBMV pós), apresentaram maior recrutamento de granulócitos no primeiro período avaliado, sendo predominantemente neutrófilos dada as condições, e aumento de linfócitos (%) após 2 dias. No entanto, o grupo Lesão apresentou recrutamento granulocitário tardio, com aumento circulante dessas células após 2 e 5 dias. A FBMV preventiva apresentou maior recrutamento leucocitário total, devido ao aumento dos monócitos circulantes. Adicionalmente, a FBMV terapêutica acarretou em modulações positivas em aspectos relacionados as hemácias e hemoglobina, como no volume corpuscular médio das hemácias e no aumento da massa de hemoglobina corpuscular média e ambos os grupos FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós apresentaram manutenção da concentração média de hemoglobina celular.

A hemoglobina é uma biomolécula abundante nas hemácias, sendo uma metaloproteína responsável pelo transporte de oxigênio e remoção do dióxido de carbono no sangue, por meio da circulação das células vermelhas. Faber et al. (2003) demonstraram que a hemoglobina e oxi-hemoglobina apresentaram picos no coeficiente de absorção, sendo maior entre os comprimentos de onda de 425-450 nm (azul) e segundo pico 520-600 nm (verde) (Faber et al., 2003). Esse aspecto referente aos picos de absorção foi recentemente corroborado pela avaliação de Zhu e colaboradores (2022), entretanto a irradiação espectro de 450 nm ($170,5 \text{ J/cm}^2$, 180 min) apresentou influência negativa sobre propriedades reológicas, como na formação de agregamento e danos morfológicos as hemácias, devido seu maior espectro de absorção em relação ao comprimento de onda de 520 nm (Zhu et al., 2022). Em relação ao espectro infravermelho, os estudos apresentam um último pico de absorção da hemoglobina por volta de 780 nm, porém com menor coeficiente em relação aos

comprimentos azul e verde (Faber et al., 2003; Zhu et al., 2022). Os resultados do presente estudo apresentaram que a FBMV no espectro infravermelho (780 nm) sobre o sistema vascular de forma não-invasiva não causou alterações nos aspectos hematimétricos pelos dados de hemoglobina corpuscular média (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Porém, na avaliação entre os grupos experimentais, o grupo Lesão apresentou redução destes índices e na concentração de hemoglobina após 2 dias enquanto os grupos tratados não se diferiram do grupo Controle.

Um estudo clínico conduzido por Linares et al. (2020) avaliou a concentração da hemoglobina total em musculo flexor ulnar do carpo submetido a irradiação local com LED infravermelho (850 nm, 50 mW, 10 J/cm², 2 J) e verificou um aumento da concentração da hemoglobina total imediatamente após as irradiações, indicando que a FBM promoveu o balanço entre a entrega e utilização de oxigênio (Linares et al., 2020). Considerando a relação da FBM com as hemoglobinas, adicionalmente Lohr et al. (2009) descreveram que a irradiação no espectro vermelho/infravermelho próximo foi capaz de liberar o NO do complexo nitrosil presentes nas hemoglobinas e mioglobinas, assim aumentando a concentração de NO circulante e atuando com efeito cardioprotetor. A irradiação acelerou a auto-oxidação da HbNO para metahemoglobina, de acordo com a liberação de sua ligação ao NO e a nova ligação do nitrato ao grupamento heme, assim gerando novamente a hemoglobina na sua forma oxidada. Com isso, concluíram que a irradiação com LED 670 nm pode ser utilizada como um agente promotor da liberação do NO das hemoglobinas (Lohr et al., 2009).

Com essa premissa, apesar de não ter havido alteração nas concentrações de hemoglobina, o presente estudo apresentou resultados positivos no que se refere aos aspectos histológicos musculares de neovascularização e aos eritrócitos circulantes. Os resultados apresentados na avaliação hematológica da concentração de eritrócitos, demonstraram que os grupo submetido a FBMV preventiva não apresentou redução do número de eritrócitos em relação ao controle e que houve redução no grupo Lesão após 1 dia. Os dados hematológicos corroboram com o estudo de Wu et al. (2004), onde atletas de alto-rendimento após completar uma ultramaratona (100 km)

apresentaram a queda significativa na concentração de hemoglobina após 2 dias da competição (Wu et al., 2004), sendo esse semelhante achado pelo grupo Lesão no presente estudo. Esses resultados podem ser explicados pelo aumento da hemólise devido ao trauma mecânico muscular gerado nos atletas e a mimetização desse processo através da indução nos animais. De forma benéfica, o tratamento com FBMV apresentou manter os níveis da concentração de hemoglobina estáveis, mesmo aplicada de forma prévia ou pós a indução da criolesão.

Um único estudo encontrado na literatura conduzido por Tanin et al. (1996) utilizou um modelo de lesão do nervo ciático periférico (Tanin et al., 1996) em coelhos submetidos a neurorrafia e tratados com ILIB no comprimento de onda vermelho (628 nm, 2-2,5 mW, 10 min, 1,2-1,5 J) por meio da inserção de um cateter na veia auricular. Os resultados mostraram um aumento dos níveis de hemoglobina e trombócitos, aumento da proteína total, albumina sérica e redução leucocitária quando avaliada a composição de células sanguíneas de animais lesionados e tratados com ILIB.

Outros aspectos hematológicos avaliados não apresentaram modificações entre os grupos experimentais avaliados. Apenas o grupo FBMV pré + Lesão apresentou leve redução no coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos apenas no dia 1, tendo reestabelecimento dessa variação de tamanho das hemácias nos demais períodos avaliados. A invariabilidade de determinados componentes e coeficientes hematológicos, como o hematócrito, concentração de plaquetas, plaquetócrito e a amplitude da distribuição de plaquetas, indicam que a administração dos parâmetros dosimétricos utilizados nesse estudo, tal como a quantidade de irradiações tendo o sangue como o principal alvo da FBMV, demonstram que não foram gerados danos as células constituintes do sangue. Os achados do presente estudo corroboram com os resultados de Siposan e Lukacs (2000), onde avaliaram a aplicação da FBM (632,8 nm, 1 mW, 30 mW/cm², 0,80 - 4,40 J/cm²) no sangue total de humanos sadios e concluíram que os parâmetros utilizados não foram capazes de alterar os parâmetros hematimétricos, porém promoveu o aumento de leucócitos totais, granulócitos e monócitos, além do aumento de hemácias e hemoglobina (Siposan and Lukacs, 2000).

Baseado nos mecanismos de ação já estabelecidos, a FBM apresenta como cromóforos alvos primário, presente nos tecidos e células, sendo o citocromo C oxidase (Karu, 2014; de Freitas and Hamblin, 2016). Devido sua capacidade de absorver os fótons emitidos, essa interação mitocondrial promove a amplificação do potencial da membrana e gera aumento da síntese de ATP, modificação na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), Ca^{2+} e NO. Além disso, há a sinalização a nível nuclear atuando na modulação da expressão e síntese de marcadores (Karu, 2014). Os canais iônicos também foram identificados como sendo um segundo mecanismo biológico. Atribuiu-se as opsinas, que pertencem a classe dos receptores ligados a proteína G, a capacidade de ligar-se aos canais iônicos e transduzir os efeitos da FBM. A ativação desses receptores e canais iônicos promovem o aumento da permeabilidade da membrana aos íons de cálcio, sódio e magnésio (Osipov et al., 2018). Porém, esses mecanismos não se aplicam a forma de irradiação da FBMV, por apresentar diferente tecido para a entrega da energia durante a irradiação.

Assim, considerando a irradiação dos elementos do sangue e os possíveis mecanismos de ação da FBMV, Kujawa et al. (2004) demonstraram que a FBM *in vitro* com laser infravermelho (810 nm, 10-400 mW, 3,73-250 J/cm²) sobre eritrócitos humanos, apresentou efeitos sobre a ativação da bomba sódio potássio (Na^+ , K^+ -ATPase) quando irradiado com menores potências, sendo que 400 mW apresentou a inibição enzimática desta (Kujawa et al., 2004). Assim, concluíram que os efeitos pronunciados são dose-dependentes, de forma que a FBM intravascular (ILIB) possa apresentar potenciais efeitos devido sua entrega de pequena dose e energia diretamente as hemácias (Kujawa et al., 2004). De forma adicional, Osipov e colaboradores (2018) apontam a absorção dos fótons pelas porfirinas, derivadas da protoporfirina IX, aumentando a permeabilidade da membrana aos íons Ca^{2+} e o consequente aumento de sua concentração citoplasmática (Osipov et al., 2018). Destaca-se que a inserção do íon Fe^{2+} ao anel pirrólico formado pela protoporfirina IX leva a formação do grupamento heme (Krishnamurthy et al., 2007).

No que se refere a ativação leucocitária após processos de lesão e inflamação, devido a necessidade da elevação da produção de citocinas e

quimiocinas e a migração para os tecidos, essas células podem exibir alterações em suas funções (Faas and de Vos, 2020). Em função da demasiada demanda de energia, monócitos e macrófagos de perfil M1 apresentam aumento da captação de glicose e ativação da via glicolítica. As células imunes, no geral, utilizam a via glicolítica aeróbia como meio de produção de ATP, tendo a fosforilação oxidativa como a principal via metabólica (Faas and de Vos, 2020).

Outro aspecto interessante referente a FBMV e leucócitos é que o espectro de absorção pode variar de acordo com a polarização exibida por eles. Sousa e colaboradores (2021) (Sousa et al., 2021) avaliaram, *in vitro*, o espectro de absorção óptica de forma individual em leucócitos humanos polarizados para diferentes perfis e observaram que os monócitos de perfis M0, M1 e M2 apresentaram alta absorbância nas regiões do comprimento de onda vermelho e infravermelho (620-820 nm), assim como linfócitos L0 e L1. Desta forma, a utilização do comprimento de onda de 780 nm no presente estudo justifica-se por se encontrar dentro do espectro de absorção para essas células envolvidas nas diferentes fases de inflamação e reparo muscular.

Diversos estudos *in vitro* avaliaram os efeitos da FBM utilizando LBI infravermelho em linhagem de monócitos (820 nm, 15 mW, 2,4 J/cm²) e evidenciaram efeitos sobre a proliferação de fibroblastos cultivados em seu meio condicionado (Young et al., 1989). Outro estudo avaliou os efeitos da FBM sobre linhagem de monócitos humanos posteriormente ativadas para perfil pró-inflamatório (808 nm, 170 mW) com aumento (1 J/cm², 3,8 J; e 2 J/cm², 7,6 J) ou redução (3 J/cm², 11,4 J) da expressão de *CCL2* e redução de mRNA *CXCL10* e *TNF-α* (1 J/cm², 3,8 J) (Chen et al., 2014).

Já Musawi e colaboradores (2017) não evidenciaram efeitos da FBM (780, 10 mW, 36, 54, 72 ou 90 J/cm²) sobre linfócitos humanos, porém notáveis resultados no aumento da proliferação com a utilização do laser âmbar (589 nm, 72 J/cm²) (al Musawi et al., 2017). Adicionalmente, após a comparação dos comprimentos de onda 780 e 660 nm, com diversos parâmetros dosimétricos, um estudo apresentou efeitos da ativação do complexo NADPH oxidase, aumento da produção de ROS e NO e aumento na expressão de *TNF-α* em cultura primária de monócitos de humanos tratados com FBM vermelho (660 nm, 400 J/cm²) sobre a atividade microbida do co-cultivo com *C. albicans* (de Castro

et al., 2022). Dessa forma, o estudo de Castro e colaboradores (2022) indicou a função da FBM na indução de marcadores pró-inflamatórios, sendo uma ferramenta promissora na ativação do sistema imune contra doenças infecciosas.

Tendo em vista que no presente estudo todos os leucócitos circulantes foram irradiados, ou seja, o sangue em sua totalidade, os resultados apresentaram um maior recrutamento de leucócitos total circulantes quando observado o grupo FBMV pré + Lesão em 1, 2 e 5 dias, sendo verificado o aumento de granulócitos após 1 dia da lesão com progressiva redução nos períodos posteriores e um aumento de monócitos circulantes após 2 e 5 dias. No grupo lesão sem irradiação houve um aumento de recrutamento de células inflamatórias para o local de lesão e esse fator pode estar relacionado com a consecutiva e elevada concentração de granulócitos circulantes após 2 e 5 dias, acarretando a prolongada manifestação de mionecrose e o deficiente reparo tecidual apresentado pela diminuta presença de fibras novas e imaturas.

É demonstrado na literatura que a supressão do recrutamento de macrófagos após lesão e durante o processo de regeneração muscular acarretam a redução da expressão de fatores regulatórios miogênicos (*MyoD* e *miogenina*) fundamentais nos processos de proliferação e diferenciação dos mioblastos, assim como essa supressão está relacionada ao aumento da expressão de citocinas e quimiocinas de caráter pró-inflamatório, incluindo *IL1- β* , *TGF- β 1*, *TNF- α* e *RANTES*, durante as fases tardias do processo de regeneração muscular (Liu et al., 2017). Da mesma forma, a predominância prolongada dos macrófagos de perfil M1 no tecido muscular após a lesão e o atraso em sua transição para o fenótipo M2 acarretam a persistente presença de citocinas de caráter inflamatório que prejudicam o processo de regeneração (Liu et al., 2017; Wosczyzna and Rando, 2018).

Com relação aos efeitos da FBMV na síntese de citocinas inflamatórias durante o reparo muscular os resultados evidenciaram que houve um aumento de *TNF- α* no grupo Lesão + FBMV pós nos dias 1, 2 e 5. Esses resultados diferem do verificado quando a aplicação da FBM foi feita localmente no mesmo modelo de lesão muscular (Souza et al. 2018), uma vez que estes autores evidenciaram que a FBM local (660 e 780 nm, 70 mW, 25,025 J/cm², 8 pontos,

1J/ponto) induziu a redução da expressão gênica de *TNF- α* no dia 2 em ambos os comprimentos de onda avaliados, sendo o LBI infravermelho com efeitos mais pronunciados sobre a organização morfológica e na otimização da transição da fase pró-inflamatória para regenerativa (Souza et al., 2018).

Da mesma forma, o estudo conduzido por Alves et al. (2016) encontraram redução da expressão da citocina inflamatória analisada, a IL-6, na avaliação dos efeitos da FBM local (780 nm, 40 mW, 10 J/cm²/ponto, 8 pontos, 3,2 J) aplicada de forma prévia ou pós a criolesão, além da verificação sobre a expressão gênica de fatores regulatórios miogênicos. Verificaram que a FBM pós lesão promoveu o aumento da expressão de *MyoD* após 3 e 7 dias, *miogenina* em 14 dias e que ambas as irradiações locais pré e pós reduziram o mRNA de *IL-6* após 3 e 7 dias. Desta forma, o estudo concluiu que a forma preventiva acarretou a modulação da expressão de *IL-6*, com possíveis efeitos protetores ao dano e a atenuação do processo inflamatório muscular (Alves et al., 2016).

Utilizando o mesmo modelo experimental de criolesão do presente estudo, autores apresentaram aumento de mRNA de *TNF- α* e *IL-1 β* do grupo lesão após 7 dias, no entanto a FBM local aplicada após a lesão (660 nm, 20 mW, 5 J/cm²/ponto, 8 pontos, 1,6 J) promoveu a redução desses marcadores no período citado (Mesquita-ferrari et al., 2010; Fernandes et al., 2013). O aumento de TNF no microambiente promove sua ligação aos seus devidos receptores de membrana (TNFR) presentes em macrófagos, gerando uma cascata de fosforilação e ativações intracelulares e subsequente ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) para, finalmente, acionar genes alvos essenciais na manutenção da fase pró-inflamatória, como CCL2 (MCP-1), IL-6, TNF, IL-1, iNOS (James G Tidball, 2017).

Em estudo *in vitro* de Santos et al (2020), os autores apresentaram que a maior produção proteica de *TNF- α* pode estar relacionada ao estado de proliferação de mioblastos C2C12 cultivados em meio condicionado de macrófagos ativados para perfil M1, quando ambas as células foram tratadas com LBI (780nm, 70 mW, 1,05 J) (Santos et al., 2020). Assim, como descrito na literatura, o aumento de *TNF- α* no tecido muscular após lesão está relacionado ao aumento do recrutamento de neutrófilos e posteriormente de macrófagos. Neste sentido, os animais que receberam a FBMV pós lesão apresentaram um

aumento desta citocina em relação ao grupo somente lesão contudo, analisando em conjunto com os resultados para produção de MCP-1, que também se encontrou em níveis elevados nos grupos irradiados nos primeiros dias (1, 2 e 5), podemos inferir que a FBMV interferiu temporalmente no recrutamento das células inflamatórias. Além disso, os achados de aspectos morfológicos e celulares reforçam essa hipótese de que o aumento destas citocinas não dificultou o processo de reparo muscular e sim trouxe efeitos positivos que puderam ser avaliados, incluindo a redução de mionecrose, aumento da vascularização e fibras novas e imaturas.

A ligação desta citocina nos receptores de membrana de células precursoras miogênicas e a fosforilação e ativação em cascata intracelular, acarretam o silenciamento dos fatores de transcrição *Paired box (Pax7)*, que são altamente expressos em CS em estado quiescente, desta forma mantendo o tecido em estado de miogênese (James G Tidball, 2017). Porém, a alta e prolongada concentração de TNF- α nesse tecido pode causar a inibição do processo de diferenciação inicial dos mioblastos em miotubos, acarretando no processo deletério de regeneração muscular (Chazaud et al., 2003b; Saclier et al., 2013).

Adicionalmente, o estudo de Almeida et al. (2014) compararam os tratamentos com crioterapia, fármaco anti-inflamatório não esteroidal (diclofenaco) e diferentes doses do LBI pulsado aplicado localmente (904 nm, 700 Hz, 60 mW, 1, 3, 6 ou 9 J/ponto) em animais com lesão muscular induzida por trauma e verificaram que não houve diferenças na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 dos grupos que receberam crioterapia, fármaco e FBM quando aplicadas energias mais altas, evidenciando que somente LBI quando aplicado com energias mais baixas (1 J) induziu redução dessas citocinas inflamatórias (de Almeida et al., 2014). Dessa forma, o estudo argumenta a dificuldade no estabelecimento da dose e parâmetros ideais. No presente estudo, uma vez que o grupo FBMV preventiva apresentou menor produção proteica de TNF- α em comparação ao grupo FBMV terapêutica e não apresentaram diferenças de monócitos circulantes entre eles, esse aspecto pode ter se dado devido a influências da dose do LBI aplicada, sendo que a quantidade de irradiações foi maior no grupo Lesão + FBMV pós.

Utilizando a FBMV não invasiva, Ramos et al. (2018) em modelo de lesão aguda cutânea em ratos Wistar, aplicaram o LBI (660 nm, 3,57 W/cm², 900s, 6,426 J) sobre a artéria auricular esquerda de ratos Wistar e avaliaram grupos de irradiação única (2h após) ou duas irradiações (2h e 48h), não sendo encontradas diferenças sobre a expressão de enzimas antioxidantes (SOD1, catalase, glutathione 4) e sobre a produção sérica das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e proteína C-reativa, porém foi observado um aumento de glândulas sebáceas, organização da epiderme e melhor distribuição das fibras colágenas na região da lesão em animais irradiados apenas uma vez (F. S. Ramos et al., 2018).

Os resultados do presente estudo demonstraram também que a FBMV foi capaz de modular a síntese de MCP-1 tendo sido evidenciado um aumento já após um dia no grupo que recebeu a irradiação pós (Lesão + FBMV pós) e após 2 dias no grupo que recebeu irradiação prévia (FBMV pré + Lesão) e gradativa redução nos grupos FBMV nos períodos posteriores, voltando a ser semelhante ao grupo controle após 7 dias, enquanto no grupo Lesão continuou a ser maior ainda após 7 dias.

Considerando o papel das quimiocinas e do recrutamento/fenótipo de macrófagos para o reparo muscular, Lu e colaboradores (2011) em modelo de lesão aguda muscular induzida por cloreto de bário em camundongos CCL2^{-/-} (MCP-1), demonstraram o prolongamento de mionecrose após 7 dias, redução do volume muscular e área de secção transversa após 21 e 42 dias. Adicionalmente, o estudo apresentou a deficiência do recrutamento e presença de macrófagos no tecido muscular em 3 e 7 dias, por outro lado o tecido apresentou a retardada presença de neutrófilos, com elevado número desse tipo celular após 1, 3 e 7 dias (Lu et al., 2011). Dessa forma, no presente estudo, ressalta-se o infiltrado inflamatório exacerbado apresentado pelo grupo Lesão em 1, 5 e 7 dias, incutindo que a maior produção de MCP-1 pelos grupos tratados, nos períodos iniciais de avaliação, pode ter sido explicada pelo recrutamento antecipado de macrófagos. Enquanto o grupo não-tratado e lesionado (Lesão) apresentou menor produção de MCP-1 o que pode ter prolongado o recrutamento de monócitos e, conseqüentemente, afetado a resolução do processo inflamatório. Porém, para a comprovação desta hipótese

há necessidade de estudos futuros que incluam a análise diferencial tecidual de monócitos e os diferentes perfis de macrófagos.

A expressão e produção das MCPs são reguladas durante o processo de diferenciação dos mioblastos a miotubos, sendo que Henningsen et al. (2011) demonstraram que a estimulação *in vitro* com TNF- α de mioblastos induzidos a diferenciação ocasionou no aumento de MCP-1 (Henningsen et al., 2011). Shireman et al. (2007) reportaram o recrutamento tardio de macrófagos e, conseqüentemente, a deficiência no processo de regeneração muscular em modelo pós indução de lesão isquêmica em camundongos *knockout* para MCP-1 (Shireman et al., 2007). Adicionalmente, Miyakawa e colaboradores (2020) demonstraram a expressão de MCP1+ em células satélites musculares e macrófagos em modelo de compressão muscular, além de reduzir a sua expressão imunológica tecidual em 9 e 12h em animais submetidos a lesão e tratados com crioterapia (Miyakawa et al., 2020). Em relação a modulação gerada pela FBM dessa quimiocina, um estudo avaliou sua expressão sérica por citometria de fluxo em modelo de inflamação tecidual gerado por lesão cutânea em camundongos BALB/c submetidos a FBM local (780 nm, 20 mW, 10 J/cm²/ponto, 3 pontos, 1,2 J total) e verificaram redução sérica de MCP-1 em 12, 36 e 84h após ao procedimento cirúrgico (Fukuda et al., 2013).

Dentro deste contexto, alterações nos componentes intrínsecos e extrínsecos podem acarretar prejuízos ao processo de reparo muscular. A desregulação da ativação fenotípica e influxo tecidual exacerbado dos macrófagos, por exemplo, propiciando o desenvolvimento de fibrose muscular (Rodríguez et al., 2010; Tedesco et al., 2010; Fernandes et al., 2015; Kim and Lee, 2016). Os macrófagos participam na amplificação do processo inflamatório nas fases pós lesão e também são capazes de atenuar a exacerbação desse processo, a fim de evitar danos ao tecido. Ou seja, podem ter efeitos benéficos ou deletérios a depender das circunstâncias do microambiente (Arnold et al., 2007).

Neste estudo, o padrão de reparo gerado no tecido pela FBMV evidenciado pela quantificação na análise histológica foi compatível com os relatos na literatura para criolesão em ratos e aplicação da FBM sobre o sítio da lesão (Alves et al., 2014; Ribeiro et al., 2015; Souza et al., 2018). Os presentes

resultados da análise morfológica do tecido muscular evidenciaram que a FBMV foi capaz de modular de forma positiva o processo inflamatório e reparo e que essa diferiu dependendo do momento de aplicação da FBMV. De acordo com esses achados, Ribeiro e colaboradores (2015) evidenciaram que a FBM prévia aplicada localmente na área da lesão muscular aguda (criolesão) (780nm, 40 mW, 10J/cm²/ponto, 8 pontos, 3,2 J) induziu a redução de mionecrose após 1 e 3 dias e redução da presença de células inflamatórias após 3 dias e um aumento na presença de fibras imaturas após 7 dias, assim como o aumento do número de vasos sanguíneos após 3 e 7 dias, além de apresentarem resultados positivos referentes a organização e deposição de colágeno, promovendo melhor organização e função tecidual após a lesão (Ribeiro et al., 2015). Os resultados presentes utilizando a FBMV previamente a lesão e os mesmos parâmetros dosimétricos demonstraram a redução da mionecrose em todos os períodos avaliados, assim como a redução do infiltrado inflamatório após 1, 5 e 7 dias. Além de apresentar expressivo aumento de fibras novas e imaturas após 5 e 7 dias e no avançado aumento da vascularização observado em todos os períodos experimentais. A FBMV (pré e pós lesão) foi capaz de aumentar o número de vasos maduros no sítio da lesão muscular após 1 e 2 dias e quando utilizada pré lesão esse aumento também aconteceu após 5 e 7 dias. Os resultados indicam que de forma semelhante a FBM local, a FBMV preventiva acarreta a modulação do recrutamento de células inflamatórias, assim como a redução da mionecrose tecidual. Foi também observado o aumento da vascularização tecidual no grupo Não Lesionado + FBMV que sugere um mecanismo de pré-condicionamento tecidual, demonstrado especialmente pelo aumento de vasos sanguíneos neste grupo.

Em estudo prévio, conduzido e recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa, ratos Wistar foram submetidos a criolesão de músculo TA e tratados com FBMV de forma preventiva ou terapêutica (780 nm, 40 mW, 80 J/cm², 80 s) também sobre a veia/artéria localizada na base da cauda (Lopez et al., 2022). A avaliação macroscópica muscular qualitativa permitiu verificar a redução da área da lesão nos grupos FBMV pré e pós após 5 e 7 dias, com efeitos pronunciados na forma preventiva da irradiação. Os resultados histológicos qualitativos apresentaram que a FBMV promoveu a redução do

edema e infiltrado inflamatório e aumento de fibras novas e imaturas após 5 dias em ambos os grupos tratados, porém o grupo FBMV prévia apresentou efeitos pronunciados na redução da mionecrose após 5 e 7 dias e na redução do infiltrado inflamatório tecidual após 7 dias. Os resultados apresentados no presente estudo corroboram com as evidências iniciais de Lopez e colaboradores (2022) e permitiram a avaliação quantitativa destes achados evidenciando que o grupo FBMV pré + Lesão apresentou redução do infiltrado inflamatório comparado ao grupo Lesão após 1, 5 e 7 dias e considerando a mionecrose ambos os grupos lesionados e tratados (FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós) apresentaram redução em relação ao grupo Lesão em todos os períodos avaliados. Em adição, os presentes achados do processo de reorganização muscular, indicado pela presença de fibras novas e imaturas, demonstraram que este foi modulado positivamente nos grupos FBMV preventiva e terapêutica após 5 e 7 dias.

Recentemente foram publicados estudos que utilizaram a FBMV em modelos animais de hipertrofia muscular compensatória (Martinelli et al., 2022) e lesão nervosa periférica (Araujo et al., 2022). A comparação da FBM local (780nm, 40 mW, 10J/cm²/ponto, 8 pontos, 3,2 J) e vascular (780nm, 40 mW, 80J/cm², 1 ponto sobre veia/artéria caudal, 3,2 J) foi demonstrada em modelo de hipertrofia compensatória do musculo plantar, sendo que a FBMV apresentou efeitos mais pronunciados sobre o aumento da área de secção transversa e diâmetro das fibras musculares após 7 e 14 dias em relação a aplicação local (Martinelli et al., 2022). Adicionalmente, a utilização da FBMV em modelo de lesão nervosa periférica e utilizando diferentes fontes de luz, coerente (LBI, 780nm, 40 mW, 80J/cm², 1 ponto sobre veia/artéria caudal, 3,2 J) e não-coerente (LED, 850nm, 40 mW, 1,07 J/cm², 1 ponto sobre veia/artéria caudal, 3,2 J) demonstrou ser efetiva para aumento da funcionalidade após 14 dias, sensibilidade mecânica após 14 dias e morfológicos com aumento da área de secção transversa após 7 dias, sendo os efeitos mais pronunciados quando utilizado o LBI (Araujo et al., 2022). De modo comparativo com os resultados, o presente estudo utilizou os mesmos parâmetros dosimétricos e apresentou efeitos positivos da FBMV aplicada em diferentes momentos sobre o número de fibras novas e imaturas, assim incutindo a capacidade dessa forma terapêutica

com efeitos sistêmicos no processo de remodelamento muscular após lesão aguda.

Em adição, a possibilidade das comparações das técnicas de FBM sistêmica (FBMS), sendo de forma invasiva (ILIB) ou não-invasiva (FBMV) podem ser realizadas entre o presente estudo e os diferentes modelos experimentais apresentados na literatura. Os estudos indicam os potenciais efeitos *in vivo* da FBMV sobre condições acarretadas pela resistência arterial (Roshchina et al., 2003; Komori et al., 2009) e doenças metabólicas (Amjadi et al., 2019), e acometimentos pulmonares (da Silva et al., 2020; Alonso et al., 2021), inclusive com a utilização do LBI no espectro infravermelho (Roshchina et al., 2003; Komori et al., 2009) e mesmo local de irradiação como utilizado no presente estudo.

Silva et al. (2020) demonstrou que o tratamento com FBMV transcutâneo com LED (660 nm, 100 mW, 15 J), sobre a cauda de ratos que foram induzidos a lesão aguda pulmonar por sepse, promoveu a redução de leucócitos totais e granulócitos presentes no sangue periférico, além da redução na contagem total de células contidas na medula óssea. Os autores sugerem que a redução na quantificação medular possa ser devido ao intenso recrutamento de células de defesa para os pulmões, via quimiotaxia, durante o processo inflamatório tendo assim um efeito imunossupressor (da Silva et al., 2020). Na avaliação da FBMV utilizando LED (660 nm, 100 mW, 15 J, 150 s, 2x/dia por 3 dias consecutivos) aplicado de forma transcutânea sobre a artéria caudal de ratos em modelo de asma induzida também houve a redução do recrutamento leucocitário presente no lavado bronco alveolar, redução na degranulação de mastócitos e aumento da síntese proteica de IL-10 (Alonso et al., 2021).

Para o melhor entendimento da mobilização celular durante a fase inflamatória pós lesão muscular e de seu compartimento de reserva, a investigação do número de células presentes no sangue periférico assim como contidos na medula óssea se mostram necessários. Tuby et al. (2011) demonstraram que a irradiação com LBI (804 nm, 400 mW, 10 mW/cm², 100 s, 1 J/cm²) sobre a área medial do osso tíbia foi capaz de aumentar a proliferação de células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSCs) em modelo de infarto agudo do miocárdio de ratos Wistar, além de que a irradiação foi capaz

de induzir o maior recrutamento de células autólogas da medula óssea para o ventrículo direito e a área infartada (Tuby et al., 2011). O estudo indica, em sua conclusão, que a utilização dessa forma de irradiação possa auxiliar na terapia pós acometimento de lesões em outros órgãos ou tecidos. Em recente revisão sistemática, Oron (2019) concluiu que o LBI é capaz de induzir a proliferação de células de defesa aumentando assim o número de células circulantes e, consequentemente, o recrutamento destas para o local da lesão (Oron, 2019). Portanto, a avaliação das possíveis influências da FBMV, como sobre o recrutamento medular, possa trazer importantes respostas referentes aos efeitos no aspecto sistêmico dessa terapia.

Dessa forma, o conjunto dos resultados apresentados sugerem a efetiva influência da FBMV sendo capaz de modular vários aspectos relacionados ao processo de regeneração do músculo lesionado. Dentre as limitações identificadas no presente estudo, vale ressaltar a diferença na quantidade total de irradiações entre os grupos FBMV pré + Lesão e Lesão + FBMV pós, uma vez que pode haver diferenças devido a quantidade de energia total entregue a corrente sanguínea. Por se tratar de um estudo preliminar utilizando essa modalidade de irradiação, faz-se necessário estudos futuros que permitam a caracterização diferencial dos fenótipos apresentados pelos leucócitos no sítio da lesão e a expressão gênica de fatores envolvidos no processo de reparo muscular.

De forma adicional, os aspectos gerais encontrados na condução da revisão sistemática abordando a FBM sistêmica (ILIB e FBMV) modelos animais utilizando o LBI, nove artigos originais cumpriram os critérios de inclusão e foram avaliados criticamente. A utilização de laser no espectro vermelho foi prevalente e a FBMV (não-invasiva) predominou sobre o ILIB (invasivo). Não foram encontrados padrões nos parâmetros dosimétricos. Contudo, os estudos mostraram os efeitos positivos da FBMV na pressão arterial e circulação sanguínea, os efeitos positivos do ILIB na composição do sangue e marcadores hematológicos, bem como os efeitos positivos de ambas as formas de FBM sistêmica (ILIB e FBMV) no processo de reparação de tecidos. Em conclusão, os estudos avaliados na presente revisão mostraram que a utilização de FBM sistêmica com ILIB ou FBMV não-invasiva induziu efeitos positivos, modulando

as condições metabólicas e a reparação tecidual. Contudo, há necessidade de padronização nos parâmetros dosimétricos para as diferentes condições e processos avaliados utilizando modelos experimentais.

6 Conclusão

Em conclusão, a terapia com FBMV infravermelho mostrou-se eficaz na modulação positiva dos aspectos hematológicos e leucocitários circulantes e no recrutamento tecidual, bem como na modulação de aspectos histológicos no sentido da melhora do remodelamento tecidual, sendo os efeitos mais pronunciados quando a FBMV aplicada de forma preventiva a lesão muscular. Além disso, a FBMV preventiva e terapêutica foram capazes de modular os marcadores pró-inflamatórios TNF- α e MCP-1 de forma favorável ao processo de reparo muscular.

7 Referências

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;34:187-93. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4031>

Ailioaie LM, Litscher G, Weber M, Ailioaie C, Litscher D, Chiran DA. Innovations and Challenges by Applying Sublingual Laser Blood Irradiation in Juvenile Idiopathic Arthritis. *International Journal of Photoenergy.* 2014:1-8

de Almeida P, Lopes-Martins RÁB, de Marchi T, Tomazoni SS, Albertini R, Corrêa JCF, Rossi RP, MacHado GP, da Silva DP, Bjordal JM, Leal Junior ECP. Red (660 nm) and infrared (830 nm) low-level laser therapy in skeletal muscle fatigue in humans: What is better? *Lasers Med Sci.* 2012;27:453-8. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0957-3>

De Almeida P, Lopes-Martins RAB, Tomazoni SS, Silva JA, Carvalho PDTC De, Bjordal JM, Leal ECP. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. *Photochem Photobiol.* 2011;87:1159-63. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00968.x>

de Almeida P, Tomazoni SS, Frigo L, de Carvalho P de TC, Vanin AA, Santos LA, Albuquerque-Pontes GM, de Marchi T, Tairova O, Marcos RL, Lopes-Martins RÁB, Leal-Junior ECP. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? *Lasers Med Sci.* 2014;29:653-8. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1377-3>

De Almeida P, Tomazoni SS, Frigo L, De Carvalho PDTC, Vanin AA, Santos LA, Albuquerque-Pontes GM, De Marchi T, Tairova O, Marcos RL, Lopes-Martins RÁB, Leal ECP. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: Low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? *Lasers Med Sci.* 2014;29:653-8. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1377-3>

Alonso PT, Schapochnik A, Klein S, Brochetti R, Damazo AS, de Souza Setubal Destro MF, Lino-dos-Santos-Franco A. Transcutaneous systemic photobiomodulation reduced lung inflammation in experimental model of asthma by altering the mast cell degranulation and interleukin 10 level. *Lasers Med Sci.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03359-1>

Alves AN, Fernandes KPS, Melo CAV, 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;29:813-21. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1428-9>

Alves AN, Ribeiro BG, Fernandes KPS, Souza NHC, Rocha LA, Nunes FD, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. 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;31:679-85. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1908-9>

Amjadi A, Mirmiranpour H, Sobhani SO, Moazami Goudarzi N. Intravenous laser wavelength radiation effect on LCAT, PON1, catalase, and FRAP in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2019;35:131-8. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02805-5>

Andreo L, Mesquita-ferrari RA, Ribeiro ÁBG, Benitte A. Effects of Myogenic Precursor Cells (C2C12) Transplantation and Low-Level Laser Therapy on Muscle Repair. *Lasers Surg Med.* 2018;50:781-91. <https://doi.org/10.1002/lsm.22798>

Araujo T, Andreo L, Tobelem D da C, Silva T, Malavazzi TC dos S, Martinelli A, Lemes B, Fernandes KPS, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effects of systemic vascular photobiomodulation using LED or laser on sensory–motor recovery following a peripheral nerve injury in Wistar rats. *Photochemical & Photobiological Sciences.* 2022. <https://doi.org/10.1007/s43630-022-00335-8>

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, Rooijen N van, Gherardi APRK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204:1057-69. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>

Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, Cury V, Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-Level Laser Therapy (808 nm) Reduces Inflammatory Response and Oxidative Stress in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion. *Lasers Surg Med.* 2013;23:726-35. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Baroni BM, Leal Junior ECP, de Marchi T, Lopes AL, Salvador M, Vaz MA. Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110:789-96. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1562-z>

Bosurgi L, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Macrophages in injured skeletal muscle: A perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. *Front Immunol.* 2011;2:1-10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00062>

Brito A de, Alves AN, Ribeiro BG, Victor D, Barbosa DE, Moreno E, Magalhaes R, Porta K, Fernandes S, Bussadori SK, Goulardins JB, Mesquita-ferrari RA. Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. *Lasers Med Sci.* 2017;33:9

de Brito Sousa K, Rodrigues MFSD, de Souza Santos D, Mesquita-Ferrari RA, Nunes FD, de Fátima Teixeira da Silva D, Bussadori SK, Fernandes KPS. Differential expression of inflammatory and anti-inflammatory mediators by M1 and M2 macrophages after photobiomodulation with red or infrared lasers. *Lasers Med Sci.* 2019;7. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02817-1>

Brunelli RM, Rodrigues NC, Ribeiro DA, Fernandes K, Magri A, Assis L, Parizotto NA, Cliquet A, Renno ACM, Abreu DCC. The effects of 780-nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. *Lasers Med Sci.* 2014;29:91-6. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1277-6>

de Castro MS, Miyazawa M, Nogueira ESC, Chavasco JK, Brancaglion GA, Cerdeira CD, Nogueira DA, Ionta M, Hanemann JAC, Brigagão MRPL, Sperandio FF. Photobiomodulation enhances the Th1 immune response of human monocytes. *Lasers Med Sci.* 2022;37:135-48. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03179-9>

Chang NC, Rudnicki MA. *Satellite Cells: The Architects of Skeletal Muscle*. 1. ed. Elsevier Inc.; 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416022-4.00006-8>

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol A, Poron F, Authier F, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003a;163:1133-43. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212046>

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *Journal of Cell Biology.* 2003b;163:1133-43. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212046>

Chen C-H, Wang C-Z, Wang Y-H, Liao W-T, Chen Y-J, Kuo C-H, Kuo H-F, Hung C-H. Effects of Low-Level Laser Therapy on M1-Related Cytokine Expression in Monocytes via Histone Modification. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:1-13. <https://doi.org/10.1155/2014/625048>

Chiran DA, Litscher G, Weber M, Ailioaie LM, Ailioaie C, Litscher D. Intravenous laser blood irradiation increases efficacy of etanercept in selected subtypes of juvenile idiopathic arthritis: An innovative clinical research approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013:1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/168134>

Chiran DA, Weber M, Ailioaie LM, Moraru E, Ailioaie C, Litscher D, Litscher G. Intravenous laser blood irradiation and tocilizumab in a patient with juvenile arthritis. *Case Rep Med.* 2014:1-6. <https://doi.org/10.1155/2014/923496>

Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, Zimowska M. The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int.* 2017;41:706-15. <https://doi.org/10.1002/cbin.10725>

Derkacz A, Protasiewicz M, Poręba R, Doroszko A, Andrzejak R. Effect of the intravascular low energy laser illumination during percutaneous coronary intervention on the inflammatory process in vascular wall. *Lasers Med Sci.* 2013;28:763-8. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1142-z>

Derkacz A, Protasiewicz M, Rola P, Podgorska K, Szymczyszyn A, Gutherc R, Poręba R, Doroszko A. Effects of intravascular low-level laser therapy during

coronary intervention on selected growth factors levels. *Photomed Laser Surg.* 2014;32:582-7. <https://doi.org/10.1089/pho.2013.3700>

Dornelles MP, Fritsch CG, Sonda FC, Johnson DS, Leal-Junior ECP, Vaz MA, Baroni BM. Photobiomodulation therapy as a tool to prevent hamstring strain injuries by reducing soccer-induced fatigue on hamstring muscles. *Lasers Med Sci.* 2019;34:1177-84. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-02709-w>

Faas MM, de Vos P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2020;1866:165845. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165845>

Faber DJ, Mik EG, Aalders MCG, van Leeuwen TG. Light absorption of (oxy-)hemoglobin assessed by spectroscopic optical coherence tomography. 2003.

Fernandes KPS, Alves AN, Nunes FD, Souza NHC, Silva JA, Bussadori SK, Ferrari RAM. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. *Lasers Med Sci.* 2013;28:1043-6. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1233-x>

Fernandes KPS, Ferrari RM, Bussadori SK, Franca CM. Vascular Photobiomodulation. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2021;39:143-4. <https://doi.org/10.1089/photob.2020.4965>

Fernandes KPS, Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Silva DDFT, Rocha LA, Alves AN, Sousa KDB, Bussadori SK, Hamblin MR, Nunes FD. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. *J Photochem Photobiol B.* 2015;153:344-51. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.015>

Ferraresi C, Beltrame T, Fabrizio F, Nascimento ESP do, Karsten M, Francisco C de O, Borghi-Silva A, Catai AM, Cardoso DR, Ferreira AG, Hamblin MR, Bagnato VS, Parizotto NA. Muscular pre-conditioning using light-emitting diode therapy (LEDT) for high-intensity exercise: a randomized double-blind placebo-controlled trial with a single elite runner. *Physiother Theory Pract.* 2015;31:354-61. <https://doi.org/10.3109/09593985.2014.1003118>

Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang Y, Victor M, Sousa P De, Bagnato VS, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 hours. *Photochem Photobiol.* 2016;91:411-6. <https://doi.org/10.1111/php.12397>

França CM, de Loura Santana C, Takahashi CB, Alves AN, de Souza Mernick AP, Fernandes KPS, de Fátima Teixeira Da Silva D, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2013;28:1331-8. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1249-2>

de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. 2016;22:348-64. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>.Proposed

Fukuda TY, Tanji MM, de Jesus JF, da Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on serum chemokine MCP-1 modulation in mice. *Lasers Med Sci.* 2013;28:451-6. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1072-9>

Goes RA, Lopes LR, Cossich VRA, de Miranda VAR, Coelho ON, do Carmo Bastos R, Domenis LAM, Guimarães JAM, Grangeiro-Neto JA, Perini JA. Musculoskeletal injuries in athletes from five modalities: A cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2020;21:1-9. <https://doi.org/10.1186/s12891-020-3141-8>

Henningsen J, Pedersen BK, Kratchmarova I. Quantitative analysis of the secretion of the MCP family of chemokines by muscle cells. *Mol BioSyst.* 2011;7:311-21. <https://doi.org/10.1039/C0MB00209G>

Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol.* 2014;5:1-22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>

Karu TI. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics.* 2014;20. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2013.2273411>

Kazemi Khoo N, Iravani A, Arjmand M, Vahabi F, Lajevardi M, Akrami SM, Zamani Z. A metabolomic study on the effect of intravascular laser blood irradiation on type 2 diabetic patients. *Lasers Med Sci.* 2013;28:1527-32. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1247-4>

KazemiKhoo N, Ansari F. Blue or red: which intravascular laser light has more effects in diabetic patients? *Lasers Med Sci.* 2014;30:363-6. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1672-7>

Kazemikhoo N, Sarafnejad AF, Ansari F, Mehdipour P. Modifying effect of intravenous laser therapy on the protein expression of arginase and epidermal growth factor receptor in type 2 diabetic patients. *Lasers Med Sci.* 2016;31:1537-45. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2012-x>

Kim J, Lee J. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase responses to muscle damage after eccentric exercise. *J Exerc Rehabil.* 2016;12:260-5. <https://doi.org/10.12965/jer.1632640.320>

Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Nishiyama K, Kondo I, Kawamata M, Ozaki M. Microcirculatory responses to acupuncture stimulation and phototherapy. *Anesth Analg.* 2009;108:635-40. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e31819317bc>

Kreslavski VD, Fomina IR, Los DA, Carpentier R, Kuznetsov V V., Allakhverdiev SI. Red and near infra-red signaling: Hypothesis and perspectives. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.* 2012;13:190-203. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.01.002>

Krishnamurthy P, Xie T, Schuetz J. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther.* 2007;114:345-58. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.02.001>

Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, PassosdosSantos R, Gaestel M, David S. TNF and Increased Intracellular Iron Alter Macrophage Polarization to a Detrimental M1 Phenotype in the Injured Spinal Cord. *Neuron*. 2014;83:1098-116. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.027>

Kujawa J, Zavodnik L, Zavodnik I, Buko V, Lapshyna A, Bryszewska M. Effect of Low-Intensity (3.75-25 J/cm²) near-Infrared (810 nm) Laser Radiation on Red Blood Cell ATPase Activities and Membrane Structure. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22:111-7. <https://doi.org/10.1089/104454704774076163>

Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Baroni BM, de Marchi T, Taufer D, Manfro DS, Rech M, Danna V, Grosselli D, Generosi RA, Marcos RL, Ramos L, Bjordal JM. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci*. 2009;24:857-63. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0633-4>

Leitão L, Alves CJ, Alencastre IS, Sousa DM, Neto E, Conceição F, Leitão C, Aguiar P, Almeida-Porada G, Lamghari M. Bone marrow cell response after injury and during early stage of regeneration is independent of the tissue-of-injury in 2 injury models. *FASEB Journal*. 2019;33:857-72. <https://doi.org/10.1096/fj.201800610RR>

de Lima Rodrigues D, Alves AN, Guimarães BR, de Alcântara Araujo Amorim WW, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. 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;33:1207-13. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2456-2>

Linares SN, Beltrame T, Ferraresi C, Galdino GAM, Catai AM. Photobiomodulation effect on local hemoglobin concentration assessed by near-infrared spectroscopy in humans. *Lasers Med Sci*. 2020;35:641-9. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02861-x>

Liu X, Liu Y, Zhao L, Zeng Z, Xiao W, Chen P. Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: The roles of regulatory factors for muscle regeneration. *Cell Biology International*. 2017;41:228-38. <https://doi.org/10.1002/cbin.10705>

Lohr NL, Keszler A, Pratt P, Bienengraber M, Warltier DC, Hogg N. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: Potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47:256-63. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.009>

Lopez TCC, Malavazzi TC dos S, Rodrigues MFSD, Bach EE, Silva DT, Hi EMB, França CM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS. Histological and biochemical effects of preventive and therapeutic vascular photobiomodulation on rat muscle injury. *J Biophotonics*. 2022:1-12. <https://doi.org/10.1002/jbio.202100271>

- Lu H, Huang D, Ransohoff RM, Zhou L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *The FASEB Journal*. 2011;25:3344-55. <https://doi.org/10.1096/fj.10-178939>
- Martineo M, Pinheiro JP, Morgado AM. Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. *J Biomed Opt*. 2014;19:1-12. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.9.098002>
- De Marchi T, Leal ECP, Bortoli C, Tomazoni SS, Lopes-Martins RÁB, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: Effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci*. 2012;27:231-6. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0955-5>
- de Marchi T, Leal-Junior ECP, Lando KC, Cimadon F, Vanin AA, da Rosa DP, Salvador M. Photobiomodulation therapy before futsal matches improves the staying time of athletes in the court and accelerates post-exercise recovery. *Lasers Med Sci*. 2019;34:139-48. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2643-1>
- Martinelli A, Andreo L, Malavazzi TC dos S, 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. <https://doi.org/10.1002/jbio.202200192>
- de Melo CAV, Alves AN, Terena SML, Fernandes KPS, Nunes FD, da Silva D de FT, 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;31:531-8. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1888-9>
- Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:49-60. <https://doi.org/10.1038/nri3132>
- Mesquita-ferrari RA, Martins MD, Silva Jr. JA, Dias T, Piovesan RF, Pavesi VCS, Bussadori SK. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci*. 2010;26:335-40. <https://doi.org/10.1007/s10103-010-0850-5>
- Mikhailov V. The use of Intravenous Laser Blood Irradiation (ILBI) at 630-640 nm to prevent vascular diseases and to increase life expectancy. *Laser Ther*. 2015;24:15-26
- Mikhailov V. Development and Clinical Applications of Intravenous Laser Blood Irradiation (Ilbi). *Laser Ther*. 2009;18:69-83. <https://doi.org/10.5978/islsm.18.69>
- Miyakawa M, Kawashima M, Haba D, Sugiyama M, Taniguchi K, Arakawa T. Inhibition of the migration of MCP-1 positive cells by icing applied soon after crush injury to rat skeletal muscle. *Acta Histochem*. 2020;122:151511. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151511>
- Momenzadeh S, Abbasi M, Ebadifar A, Aryani M, Bayrami J, Nematollahi F. The intravenous laser blood irradiation in chronic pain and fibromyalgia. *J Lasers Med Sci*. 2015;6:6-9. <https://doi.org/10.22037/2010.v6i1.7800>

Moreira E, Mesquita-ferrari RA, Miranda C, Andreo L, Kalil S, Porta K, Fernandes S. Modulating effect of low intensity pulsed ultrasound on the phenotype of inflammatory cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;96:7. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.108>

Moskvin SV. Low-level laser therapy in Russia: History, science and practice. *J Lasers Med Sci*. 2017;8:56-65. <https://doi.org/10.15171/jlms.2017.11>

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:958-69. <https://doi.org/10.1038/nri2448>

al Musawi MS, Jaafar MS, Al-Gailani B, Ahmed NM, Suhaimi FM, Suardi N. Effects of low-level laser irradiation on human blood lymphocytes in vitro. *Lasers Med Sci*. 2017;32:405-11. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2134-1>

Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*. 2013;93:875-81. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012512>

Novak ML, Weinheimer-Haus EM, Koh TJ. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. *Journal of Pathology*. 2014;232:344-55. <https://doi.org/10.1002/path.4301>

Oron U. Photobiomodulation Therapy of Cells in the Bone Marrow: A Novel Therapeutic Approach in Cell Therapy and Regenerative Medicine. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2019;37:1-3. <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4543>

Osipov AN, Machneva T v., Buravlev EA, Vladimirov YA. Effects of Laser Radiation on Mitochondria and Mitochondrial Proteins Subjected to Nitric Oxide. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00112>

De Paiva PRV, Casalechi HL, Tomazoni SS, Machado CDSM, Miranda EF, Ribeiro NF, Pereira AL, Da Costa AS, Dias LB, Souza BCG, Aguiar Lino MM, De Carvalho PDTC, Leal-Junior ECP. Effects of photobiomodulation therapy in aerobic endurance training and detraining in humans: Protocol for a randomized placebo-controlled trial. *Medicine (United States)*. 2019;98:1-6. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015317>

Pfrrmann D, Herbst M, Ingelfinger P, Simon P, Tug S. Analysis of Injury Incidences in Male Professional Adult and Elite Youth Soccer Players: A Systematic Review. *J Athl Train*. 2016;51:410-24. <https://doi.org/10.4085/1062-6050-51.6.03>

Ramos FS, da Costa Aguiar Alves B, Perez MM, Feder D, Fonseca FLA, Maifrino LBM, Alves S, Azzalis LA, Junqueira VBC. The effects of transcutaneous low-level laser therapy on the skin healing process: an experimental model. *Lasers Med Sci*. 2018;33:967-76. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2429-x>

Ramos L, Marcos RL, Torres-Silva R, Pallota RC, Magacho T, Mafra FFP, Macedo MM, Carvalho RLDP, Bjordal JM, Lopes-Martins RAB. Characterization of Skeletal Muscle Strain Lesion Induced by Stretching in Rats: Effects of Laser

Photobiomodulation. Photomed Laser Surg. 2018;36:460-7. <https://doi.org/10.1089/pho.2018.4473>

Ribeiro BG, Alves AN, dos Santos LAD, Cantero TM, Fernandes KPS, Dias D da S, Bernardes N, de Angelis K, Mesquita-Ferrari RA. 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:e0153618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153618>

Ribeiro BG, Alves AN, Santos LAD dos, 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;47:571-8. <https://doi.org/10.1002/lsm.22381>

Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2010;1803:39-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.015>

Roshchina AA, Nikolaeva SS, Kozhura VL, Teselkin YO, Babenkova I v., Yakovleva L v., Bykov VA, Novoderzhkina IS, Basarab DA, Rebrov LB, Parshina EY, Kirsanova AK. Water status and LPO in rat tissues during massive blood loss and irradiation with He-Ne laser. Bull Exp Biol Med. 2003;135:136-8. <https://doi.org/10.1023/A:1023859529038>

Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, Sailhan F, Chelly J, Pavlath GK, Mounier R, Kjaer M, Chazaud B. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. Stem Cells. 2013;31:384-96. <https://doi.org/10.1002/stem.1288>

Santos TC, de Brito Sousa K, Andreo L, Martinelli A, Rodrigues MFSD, Bussadori SK, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA. Effect of Photobiomodulation on C2C12 Myoblasts Cultivated in M1 Macrophage-conditioned Media. Photochem Photobiol. 2020:0-1. <https://doi.org/10.1111/php.13215>

Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. J Leukoc Biol. 2007;81:775-85. <https://doi.org/10.1189/jlb.0506356>

da Silva JGF, dos Santos SS, de Almeida P, Marcos RL, Lino-dos-Santos-Franco A. Effect of systemic photobiomodulation in the course of acute lung injury in rats. Lasers Med Sci. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03119-7>

Silva Junior EM da, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, Magalhães EMR, Bussadori SK, de Brito A, Messias F de M, Souza NHC, Alves AN, Fernandes KPS. The Effects of Photobiomodulation on Inflammatory Infiltrate During Muscle Repair in Advanced-Age Rats. The Journals of Gerontology: Series A. 2019;XX:1-5. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz076>

da Silva Neto Trajano LA, Trajano ETL, da Silva Sergio LP, Teixeira AF, Mencialha AL, Stumbo AC, de Souza da Fonseca A. Photobiomodulation effects on mRNA levels from genomic and chromosome stabilization genes in injured muscle. *Lasers Med Sci.* 2018;33:1513-9. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2510-0>

Siposan DG, Lukacs A. Effect of Low-Level Laser Radiation on Some Rheological Factors in Human Blood: An *in Vitro* Study. *J Clin Laser Med Surg.* 2000;18:185-95. <https://doi.org/10.1089/10445470050144038>

Sousa K de B, Silva D de FT da, Rodrigues MFSD, Garcia MP, Rodini C de O, Mesquita-Ferrari RA, Hamblin MR, Bussadori SK, Nunes FD, Fernandes KPS. Effects of the phenotypic polarization state of human leukocytes on the optical absorbance spectrum. *J Biophotonics.* 2021;14

Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, da Silva DFT, Ribeiro BG, Alves AN, Garcia MP, Nunes FD, da Silva Junior EM, França CM, Bussadori SK, Fernandes KPS. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. *J Cell Mol Med.* 2018:1-13. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13757>

Tanin L v., Petrovsky GG, Tanina RM. Blood-stimulatory and biochemical effects of intravenous laser irradiation of blood with low-active laser radiation in rabbits with peripheral nerve damage. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering.* 1996;2922:406-12. <https://doi.org/10.1117/12.260711>

Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010;120:11-9. <https://doi.org/10.1172/JCI40373>

Tidball James G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:165-78. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.150>

Tidball James G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:165-78. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.150>

Timofeyev VT, Poryadin G v., Goloviznin M v. Laser irradiation as a potential pathogenetic method for immunocorrection in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* 2001;8:35-40. [https://doi.org/10.1016/S0928-4680\(00\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4680(00)00059-6)

Tomé RFF, Silva DFB, dos Santos CAO, de Vasconcelos Neves G, Rolim AKA, de Castro Gomes DQ. ILIB (intravascular laser irradiation of blood) as an adjuvant therapy in the treatment of patients with chronic systemic diseases—an integrative literature review. *Lasers Med Sci.* 2020;35:1899-907. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03100-4>

Tomimura S, Silva BPA, Sanches IC, Canal M, Consolim-Colombo F, Conti FF, de Angelis K, Chavantes MC. Hemodynamic effect of laser therapy in spontaneously hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol.* 2014:161-4. <https://doi.org/10.5935/abc.20140117>

Tuby H, Maltz L, Oron U. Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart. *Lasers Surg Med.* 2011;43:401-9. <https://doi.org/10.1002/lsm.21063>

Vatansever F, Rodrigues NC, Assis LL, Peviani SS, Durigan JL, Moreira FMA, Hamblin MR, Parizotto NA. Low intensity laser therapy accelerates muscle regeneration in aged rats. *Photonics Lasers Med.* 2012;1:287-97. <https://doi.org/10.1515/plm-2012-0035>

Wang H, Deng J, Tu W, Zhang L, Chen H, Wu X, Li Y, Sha H. The hematologic effects of low intensity 650 nm laser irradiation on hypercholesterolemia rabbits. *Am J Transl Res.* 2016;8:2293-300

Weber MH, Fußgänger-May T, Wolf T. Die intravasale laserblutbestrahlung - Vorstellung einer neuen therapiemethode. *Deutsche Zeitschrift Fur Akupunktur.* 2007;50:12-23. <https://doi.org/10.1078/0415-6412-00282>

Wosczyzna MN, Rando TA. A Muscle Stem Cell Support Group : Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Dev Cell.* 2018;46:135-43. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.018>

Wright CR, Brown EL, Della Gatta PA, Fatouros IG, Karagounis LG, Terzis G, Mastorakos G, Michailidis Y, Mandalidis D, Spengos K, Chatzinikolaou A, Methenitis S, Draganidis D, Jamurtas AZ, Russell AP. Regulation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor in Skeletal Muscle Is Dependent Upon the Type of Inflammatory Stimulus. *Journal of Interferon and Cytokine Research.* 2015;35:710-9. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0159>

Wu H-J, Chen K-T, Shee B-W, Chang H-C, Huang Y-J, Yang R-S. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J Gastroenterol.* 2004;10:2711. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i18.2711>

Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity.* 2017;44:450-62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015.Macrophages>

Yang W, Hu P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J Orthop Translat.* 2018;13:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.01.002>

Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989;9:497-505. <https://doi.org/10.1002/lsm.1900090513>

Zhu R, Avsievich T, Su X, Bykov A, Popov A, Meglinski I. Hemorheological alterations of red blood cells induced by 450-nm and 520-nm laser radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2022;230:112438. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112438>

8 Apêndice

8.1 Apêndice A. Comprovante de submissão de artigo de revisão sistemática submetido na revista *Lasers in Medical Science*

Lasers in Medical Science

Systematic review of the effects of systemic photobiomodulation with low-level laser in experimental models
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	LIMS-D-22-00510
Full Title:	Systematic review of the effects of systemic photobiomodulation with low-level laser in experimental models
Article Type:	Review Article
Keywords:	Vascular photobiomodulation; transcutaneous irradiation; intravascular laser irradiation of blood; low-level laser therapy; in vivo; animal studies; experimental models
Corresponding Author:	Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, PhD São Paulo, BRAZIL
Order of Authors:	Tainá Caroline dos Santos Malavazzi, MS Kristianne Porta Santos Fernandes, PhD Talita Christine Camilo Lopez, PhD Maria Fernanda Setubal Destro Rodrigues, PhD Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, PhD Sandra Kalil Bussadori, PhD Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, PhD
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Tainá Caroline dos Santos Malavazzi, MS
First Author Secondary Information:	
Order of Authors Secondary Information:	

8.2 Apêndice B. Artigo publicado na revista *Journal of Biophotonics*

Received: 30 August 2021 | Revised: 26 November 2021 | Accepted: 24 December 2021
DOI: 10.1002/jbio.202100271

RESEARCH ARTICLE

JOURNAL OF
BIOPHOTONICS

Histological and biochemical effects of preventive and therapeutic vascular photobiomodulation on rat muscle injury

Talita Christine Camillo Lopez¹ | Tainá Caroline dos Santos Malavazzi¹ |
Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues¹ | Erna Elisabeth Bach² |
Daniela Teixeira Silva¹ | Edgar Matias Bach Hi³ | Cristiane Miranda França⁴ |
Sandra Kalil Bussadori^{1,5} | Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari^{1,5} |
Kristianne Porta Santos Fernandes^{1*}

¹Postgraduate Program in Biophotonics Applied to the Health Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, São Paulo, Brazil

²Instituto de Pesca de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

³Experimental Biochemistry Academic Nucleus (NABEX), UNILUS (Centro Universitário Lusiada), Santos, São Paulo, Brazil

⁴Division of Biomaterials and Biomechanics, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon, USA

⁵Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, UNINOVE, São Paulo, São Paulo, Brazil

*Correspondence

Kristianne Porta Santos Fernandes,
Biophotonics Applied to Health Sciences
Postgraduate Program, Universidade Nove
de Julho, Nove de Julho University, 235/
249 Vergueiro Street, São Paulo, SP 01525-
000, Brazil.
Email: kristianneporta@gmail.com

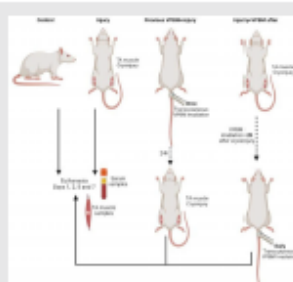
Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico, Grant/Award
Number: 304330/2020-5; Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior, Grant/Award Number:
88887.481244/2020-00; Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo, Grant/Award Number: 2013/07 502-
1; UNINOVE

Abstract

The intravascular or transcutaneous application of photobiomodulation (PBM) over blood vessels (vascular photobiomodulation, VPBM) has been used for the treatment of inflammatory and chronic conditions with promising systemic results. This study evaluated the VPBM effects on a model of muscle regeneration after acute injury and compared the outcomes of preventive and therapeutic VPBM.

Transcutaneous VPBM was administered over the rat's main tail vein. Serum levels of creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), and lactate were evaluated and muscles were processed for macroscopic and microscopic analysis. Preventive and therapeutic VPBM led to decreased inflammatory infiltrate, edema, and myonecrosis but with an increase in immature muscle fibers. CK, AST, and lactate levels were lower in the groups treated with VPBM (lowest concentrations in preventive VPBM application). Preventive and therapeutic VPBM were capable of exerting a positive effect on acute muscle injury repair, with more accentuated results when preventive VPBM was administered.



9 Anexos

9.1 Anexo 1. Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO SISTÊMICA NO REPARO MUSCULAR ESQUELÉTICO", protocolada sob o CEUA nº 4828060220 (ID 000215), sob a responsabilidade de **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** - 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 **aprova**da pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 10/03/2020.

We certify that the proposal "Effects of the systemic photobiomodulation on muscle repair.", utilizing 90 Heterogenics rats (90 males), protocol number CEUA 4828060220 (ID 000215), under the responsibility of **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** - 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 03/10/2020.

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

Vigência da Proposta: de **03/2020 a 03/2022**

Área: **Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **11 a 13 semanas** N: **90**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **220 a 235 g**

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

São Paulo, 10 de março de 2020

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

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

9.2 Anexo 2. Checklist ARRIVE 2.0

ARRIVAL 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:	3.1
	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).	3.1
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
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
Randomisation	4 a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	3.2
		3.2
Blinding	5 Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	3.2
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.	3.4-3.7
		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.	3.8
		3.8
Experimental animals	8 a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	3.1
		3.1
Experimental procedures	9 For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:	3
	a. What was done, how it was done and what was used.	3
	b. When and how often.	3
	c. Where (including detail of any acclimatisation periods).	3
Results	d. Why (provide rationale for procedures).	3
Results	10 For each experiment conducted, including independent replications, report:	4
	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.	

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.	Página 6
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 1/337-346
Objectives	13 Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	1/313-352
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.	3/4-6
Housing and husbandry	15 Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	3.1/12-15
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.	3.2/28-30 3
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.	5 5/página 86
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).	3
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.	
Data access	20 Provide a statement describing if and where study data are available.	
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.	