

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO
MOVIMENTO HUMANO**

**Efeitos da fotobiomodulação por LED na dinâmica secretória de
insulina, no músculo esquelético imobilizado e na concentração
plasmática de citocinas de ratos adultos saudáveis**

Marco Aurélio Serafim Bonvino

2020

TESE DE DOUTORADO

MARCO AURÉLIO SERAFIM BONVINO

**Efeitos da fotobiomodulação por LED na
dinâmica secretória de insulina, no músculo
esquelético imobilizado e na concentração
plasmática de citocinas de ratos adultos
saudáveis**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Doutor em Ciências do Movimento Humano. Área de concentração: Biodinâmica. Linha de pesquisa: Avaliação e Reabilitação Funcional

Orientador: Profa. Dra. Adriana Pertille

PIRACICABA
2020

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecário: Fábio Henrique dos Santos Corrêa – CRB: 8/10150

B723e Bonvino, Marco Aurélio Serafim
Efeitos da fotobiomodulação por LED na dinâmica secretória de insulina, no músculo esquelético imobilizado e na concentração plasmática de citocinas de ratos adultos saudáveis / Marco Aurélio Serafim Bonvino. – 2020.
77 fls.; il.; 30 cm.

Orientador (a): Prof. Dra. Adriana Pertille.
Tese (Doutorado) – Universidade Metodista de Piracicaba,
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano,
Piracicaba, 2020.

1. Citocinas. 2. Fototerapia. 3. Imobilização. 4. Insulina.
I. Pertille, Adriana. II. Título.

CDD – 615.83

Dedico esse trabalho ao meu eterno amigo nono Plínio e nona Áurea, que me guiaram e me conduziram com amor para a área da fisioterapia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar e dar forças em todos os momentos desta caminhada.

A minha esposa, minha maior incentivadora em todos os momentos. Com ela enfrento e venço as dificuldades.

Aos meus queridos filhos Marcela, Pedro e João Vitor, razões do meu esforço.

A todos meus parceiros de doutorado, que das mais diversas formas me auxiliaram neste período.

Aos meus orientadores Dr. Carlos Alberto da Silva e Dra. Adriana Pertille por me guiarem nessa trajetória.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Meu muito obrigado!

RESUMO

Introdução: Estudos têm demonstrado que o desuso muscular induz muitos efeitos deletérios, tais como a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, hipotrofia muscular, redução das reservas de glicogênio, da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga. Os efeitos da fotobiomodulação por LED pulsado de 630nm no tecido muscular ainda não são bem conhecidos. A presente tese concentrou suas análises em três vertentes: **Ação da ledterapia na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos**, no qual se avaliou *in vitro* se a LEDterapia modifica a resposta secretória de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose e verificou-se que promoveu aumento na secreção de insulina, potencializando o efeito gerado por concentrações crescentes de glicose; **Ações da led terapia na imobilização muscular**, onde analisou em ratos o efeito da LEDterapia em músculos submetidos a imobilização e concluiu-se que propiciou melhores condições energéticas e possivelmente estruturais, minimizando eventos da imobilização; e **Relações metabólicas e concentração de miocinas na terapia com led: estudo em músculos imobilizados**, onde foram estudados animais submetidos a imobilização muscular e analisados os seguintes parâmetros: reservas de glicogênio do músculo gastrocnêmio, a relação proteína/DNA (PT/DNA, indicativo da massa) e as concentrações plasmáticas das citocinas, IL-6, e TNF- α e verificou-se os benefícios da fototerapia com LED como coadjuvante de tratamentos que busquem melhorar as condições químico metabólicas de músculos submetidos ao desuso. **Resultados:** nos modelos de imobilização a fotobiomodulação minimizou os efeitos deletérios deflagrados pelo desuso, propiciando melhores condições metabólicas, menor perda de massa e melhora na relação proteína total/DNA. Além disto, a fotobiomodulação foi importante para a diminuição da produção da citocina TNF α , que é uma das principais citocinas de caráter inflamatório, a qual, inibe a sinalização insulínica. **Conclusão:** os trabalhos indicam que a fotobiomodulação com LED se mostrou eficaz em minimizar as alterações geradas pelo desuso muscular.

Palavras chaves: fotobiomodulação, imobilização, citocinas, insulina

ABSTRACT

Introduction: Studies have shown that muscle disuse induces many deleterious effects, such as the proliferation of intramuscular connective tissue, muscle hypotrophy, reduction of glycogen stores, capillary density, serial sarcomeres, strength and resistance to fatigue. The effects of 630nm pulsed LED photobiomodulation on muscle tissue are well known. The present thesis concentrated its analyzes on three aspects: **Action of ledtherapy on insulin secretion in isolated pancreatic islets from rats**, in which it was evaluated in vitro whether LEDtherapy modifies the secretory response of insulin in isolated pancreatic islets and incubated in the presence of different concentrations glucose and it was found that it promoted an increase in insulin secretion, potentiating the effect generated by increasing glucose concentrations; **Actions of led therapy on muscle immobilization**, where the effect of LED therapy on muscles submitted to immobilization was analyzed in rats and it was concluded that it provided better energy and possibly structural conditions, minimizing immobilization events; e **Metabolic relationships and myocin concentration in led therapy: study in immobilized muscles**, where animals subjected to muscle immobilization were studied and the following parameters were analyzed: glycogen reserves of the gastrocnemius muscle, the protein / DNA ratio (PT / DNA, indicative of mass) and plasma concentrations of cytokines, IL-6, and TNF- α and the benefits of phototherapy with LED as an adjunct to treatments that seek to improve the chemochemical metabolic conditions of muscles subjected to disuse were verified. **Results:** in immobilization models, photobiomodulation minimized the deleterious effects caused by disuse, providing better metabolic conditions, less mass loss and improvement in the total protein / DNA ratio. In addition, photobiomodulation was important to decrease the production of the cytokine TNF α , which is one of the main cytokines of an inflammatory character, which inhibits insulin signaling. **Conclusion:** studies indicate that photobiomodulation with LED has been shown to be effective in minimizing changes caused by muscle disuse.

Keywords: photobiomodulation, immobilization, cytokines, insulin.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato
AKT – Proteína quinase
AMPK - Proteína quinase b
ATP -Adenosina trifosfato
CK - Creatina quinase
dpm -Desvio padrão da média
FBM - Fotobiomodulação
Gab-1- *GRB2 Associated Binding Protein 1*
GDP -Guanosina difosfato
GLUT 4 -Proteína transportadora de glicose tipo 4
GLUT -Proteína transportadora de glicose
GLUT1 -Proteína transportadora de glicose tipo 1
Grb2 -Proteína ligante do receptor do fator de crescimento 2GTP-Guanosina trifosfato
I -Fator de crescimento insulínico
IGF1 - Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-4 - Interleucina
IP3 -Inositol trifosfato
IR -Receptor de insulina
IRS -Substrato do receptor de insulina
IRS-1 -Substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2 -Substrato 2do receptor de insulina
J/cm² - Jaules por centímetro quadrado
JAK2 - Proteína *Janus Kinase 2*
Kgf – Quilograma força
KOH -Hidróxido de Potássio
Laser - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* -amplificação da luz através de emissão estimulada de radiação
LED - *Light Emitting Diode* diodo emissor de luz.
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos
mg –Miligrama

mg/kg -Miligramas por kilograma
mg/mg -Miligrama por miligramamL -Mililitros
mM -Milimol
mMol/g -Milimol por grama
mMol/L -Milimol por litro
ms -Milisegundo
mTOR-Enzima alvo da rapamicina
mW - miliwatts
MyoD - Myoblast determination protein
nm - Nanômetros
p60^{dok} - Substrato do receptor de insulina. P4 – progesterona
PHAS1 - Proteína de ligação ao fator de tradução inicial de eucariotos
PI3K -Fosfatidilinositol-3-quinase
Ras -Subtipo monomérico de proteína ligante de nucleotídeos de guanina
RNAm -Ácido ribonucleico mensageiro
ROS - Reactive oxygen species
SH2 -Domínio 2 homólogo a Src
Shc -Proteína adaptadora de ligação a fosfotirosina contendo SH2
SHP-2 -SH2 contendo domínio de proteína tirosina fosfatase
SOS -Fator de troca do nucleotídeo guanina
Src -Família de proteínas tirosina quinase
TGF- β 1- Fator de Transformação de Crescimento Beta
TNF- α - Fator de necrose tumoral
U/Kg -Unidade por kilograma
 β -Beta

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	11
1.1 Citocinas	14
1.2 O Sinal Insulínico no Músculo Esquelético	18
1.3 Fotobiomodulação	20
1.4 Hipóteses	22
1.5 Objetivos	23
1.5.1 Objetivo Geral	23
1.5.2 Objetivos Específicos	23
1.6 Metodologias	23
1.6.1 Estudo I	24
1.6.2 Estudo II	26
1.6.3 Estudo III	28
1.6.4 Desenho do estudo	30
SEGUNDA PARTE	31
2. DESENVOLVIMENTO	32
2.1 Estudo I	32
2.2 Estudo II	44
2.3 Estudo III	55
TERCEIRA PARTE	67
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	69
5 APLICAÇÃO CLÍNICA	70
REFERÊNCIAS	71

PRIMEIRA PARTE

CONTEXTUALIZAÇÃO

HIPÓTESES

OBJETIVOS

METODOLOGIAS

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A principal diferença da luz emitida pelo LED em relação à emitida por um laser é a ausência de coerência. Essa coerência não é responsável pelos efeitos de terapias com laser de baixa potência, pois esta propriedade se perde nas primeiras camadas de tecido biológico (MAFULINI, 2002).

A razão do aumento de pesquisas buscando comparar os efeitos da fototerapia com o uso de LEDs em substituição ao laser é que, diferente do comprimento de onda, a sua coerência não é um fator importante para o efeito biomodulador. Além disso, os aparelhos que emitem radiação laser têm alto custo, fazendo-se necessária a busca por fontes luminosas alternativas. Nesse contexto, os LED's surgem como uma excelente opção em virtude do seu potencial de ação e de seu valor mais barato (SACOMO, 2008). Estudos de Karu *et al.* registraram resultados clínicos satisfatórios sob o aspecto das diferentes fontes de luz, sugerindo efeitos benéficos advindos da terapia com LED em diversos tipos de lesões cutâneas.

A plasticidade das fibras musculares esqueléticas permite que estas sejam capazes de se adaptar deflagrando mudanças no seu tamanho ou na tipagem. Múltiplos estímulos podem promover estas mudanças, merecendo destaque os modelos de desuso muscular, alterações hormonais, nutrição, estimulação elétrica neuromuscular, entre outros (LIEBER *et al.*, 2017).

Estudos têm demonstrado que o desuso muscular induz muitos efeitos deletérios, tais como a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, hipotrofia muscular, redução das reservas de glicogênio muscular, da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga (ATHERTON

et al., 2016; FRONTERA; OCHALA, 2014, YANG, 2014). Além disso, Lieber (2002) afirma que os músculos considerados antigravitacionários, os uniarticulares e os que possuem maior proporção de fibras lentas são os mais vulneráveis à atrofia.

A atrofia muscular é um processo complexo e diferenças significativas são encontradas como resultados de modelos utilizados para provocar o desuso. (HYATT *et al.*, 2019; JIN ZHOU *et al.*, 2016).

Além da redução da massa muscular, estudos têm demonstrado que o desuso induz proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, tanto no perimísio quanto no endomísio, além de induzir aumento do “*turnover*” do colágeno no tecido conjuntivo (CICILIOT *et al.*, 2013).

Na literatura há contradição no entendimento dos efeitos da redução na atividade muscular sobre proteínas não miofibrilares causando uma especificidade na resposta, ou seja, em alguns modelos experimentais observa-se redução tanto na população de proteínas transportadoras de glicose do tipo GLUT4, quanto na efetividade das proteínas sinalizadoras citosólicas. No entanto, em modelos de imobilização de membros, suspensão dos membros posteriores em ratos e protocolos de atividade física, tem sido destacado à expressão do GLUT4 e captação de glicose, dependendo de fatores como tempo e tipo de imobilização (RICHTER; HARGRAVES, 2013).

Hirose *et al.* (2000) estudaram a via sinalizadora da insulina em ratos que tiveram a pata esquerda imobilizada por fixação do joelho e tornozelo a 90° durante sete dias, e verificaram redução na transdução do sinal intracelular estimulado pela insulina, sugerindo déficit na ativação do receptor de insulina (IR) e nas moléculas ativadas a partir deste, incluindo a fosforilação do IRS-1

(substrato 1 do receptor de insulina) e a ativação da PI3-K (fosfatidilinositol 3-quinase), indicando que o quadro de resistência à insulina também pode ser desencadeado na imobilização.

No aspecto molecular, sabe-se que o fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF- β 1) é uma citocina correspondente aos membros da família do TGF- β (*β transforming growth factor*), cuja ação está em inibir a proliferação e diferenciação musculares, de tal forma a inibir a transcrição de genes da família MyoD (FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004).

Rathbone *et al.* (2011) verificaram no estudo em cultura de células satélites de ratos adultos com o implemento de TGF- β , que nas 48 horas iniciais houve decréscimo na quantidade do fator de transcrição MyoD, ponderando a interferência do TGF- β 1 na ativação celular, mantendo as células satélites quiescentes. Frente às características morfológicas, bioquímicas e funcionais da fibra muscular observadas após o desuso, diversas propostas têm sido empregadas na tentativa de minimizar os efeitos deletérios ou de acelerar a recuperação funcional pós-imobilização (KODAMA *et al.*, 2012).

Para que as células mantenham o equilíbrio metabólico e funcional necessitam de um eficiente suprimento de substâncias metabolizáveis ou que permitam recuperação a curto prazo, quando em condição de desuso, inclusive da disponibilidade de nucleotídeos, como por exemplo as células sanguíneas, que necessitam de proliferação celular rápida na medula óssea e as células da vilosidade intestinal que frequentemente necessitam de reparação (THOMSON, 2018; TIDBALL, 2011).

A maior parte dos estudos tem por objetivo verificar a efetividade dos recursos terapêuticos na recuperação tecidual pós imobilização, destacando

ações direcionadas à prevenção das alterações morfológicas e funcionais advindas da imobilização (MOON et al., 2018; SUN et al., 2013).

A terapia de fotobiomodulação (FBM) é uma modalidade promissora que ganhou popularidade em diferentes áreas da saúde. Anteriormente chamada de terapia a laser de baixo nível (LLLT) ou terapia de diodo emissor de luz (LEDT), a FBM melhorou efetivamente o desempenho muscular aumentando os tempos de exercício e reduziu a fadiga muscular, limitando as perdas de força pós-exercício (FERRARESI; HAMBLIN; PARIZOTTO, 2012).

1.1 Citocinas

As citocinas são um grupo de proteínas de baixo peso molecular, que atuam na intercomunicação celular. As citocinas são liberadas em decorrência de diferentes estímulos e interagem com os seus receptores regulando a função celular. As citocinas estão intimamente relacionadas ao processo inflamatório. O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), foi descoberto em 1975 por Carswell *et al.*, sendo considerada uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo. Ele é secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos, sendo a presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos o principal estímulo para que isto ocorra (BINGHAM, 2002).

O tecido muscular esquelético é extremamente dinâmico visto sua capacidade de responder e ajustar tanto a estímulos ambientais, quanto a capacidade de secretar muitos fatores que modulam o trofismo (BROHOLM; PEDERSEN, 2010; LIGHTFOOT; COOPER, 2016).

Muitas citocinas e fatores de crescimento são produzidos pelo próprio músculo ou pelas células inflamatórias infiltradas durante processos

regenerativos, como exemplo destacam-se o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1), fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento transformador β e interleucina (IL-4), fatores que controlam a homeostase, a regeneração e o crescimento do músculo esquelético, em parte pela regulação das funções das células satélites. (CONVIGTON *et al.*, 2016; MANABE, 2018; PEDERSON; FEBBRAIO 2012).

Durante a última década, foram reconhecidos novas miocinas produzidas principalmente pelo músculo em contração, quer seja pela dinâmica fisiológica ou através do uso de estimulação elétrica, em especial a interleucina 6 (IL-6) e um fator inibidor da leucemia (LIF). Cabe ressaltar que o equilíbrio da homeostasia metabólica depende de vários fatores, no entanto, a investigação da participação das interleucinas tem permitido uma nova visão sobre as interrelações no controle de funções anabólicas e metabólicas (PEAKE *et al.*, 2015; SANCHIS-GOMAR *et al.*, 2019).

A base científica que fundamenta as relações estruturais e funcionais entre miocinas e homeostasia do sistema músculo esquelético foi inicialmente revisada e descrita em uma publicação direcionada ao tema na década de 80 e por ser importante merece esta citação (MOOREN; VOLKER, 1985). A IL-6, primeira miocina descrita na literatura e apresentada por Steensberg *et al.* (2000), além de ser produzida no músculo esquelético em decorrência de contrações musculares também pode ser produzida em outros tecidos. Existe evidência de que a IL-6 atua estimulando a proliferação de células satélites após dano agudo e, portanto, possuindo um papel na hipertrofia muscular. Quando em exercício físico, a liberação da IL-6 se faz de forma independente da liberação do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). Nessas condições, a IL-6

atua inibindo a produção e secreção de TNF- α e seus receptores solúveis. A literatura científica demonstra que níveis circulantes elevados de IL-6 estão associados com inatividade física e o risco aumentado de síndrome metabólica (PEDERSEN, 2012; BAE, 2019).

Na literatura científica têm sido identificado múltiplas ações ligadas as miocinas IL-4, IL-15 e IL6, com destaque na capacidade de controlar a hipertrofia do músculo esquelético, aumento da oxidação do tecido adiposo, aumento da sensibilidade à insulina mediado e ação anti-inflamatória mediado principalmente pela IL-6 (LÉON *et al.*, 2012; PICCIRILLO, 2019).

Sobre a interleucina (IL) -15, é expressa no músculo esquelético e acredita-se ser uma miocina, cuja concentração aumenta rapidamente quando se eleva a contração muscular. No que se refere a IL-15 tem sido observado adaptações metabólicas, como melhora da sensibilidade à insulina e oxidação de ácidos graxos. A IL-15 secretada pela contração muscular pode, portanto, atuar como um fator endócrino para melhorar o metabolismo energético em diferentes tecidos. (FENGNA *et al.*, 2017).

Há evidências mostrando que os níveis de IL-15 são mais altos no interstício muscular e que a IL-15 pode melhorar a homeostase da glicose muscular e o metabolismo oxidativo de maneira autócrina / parácrina. Assim, tem-se demonstrado que a IL-15 atua como um fator anabólico para o músculo esquelético, e tem relação com a ativação das vias insulínicas citosólicas (FUJIMOTO *et al.*, 2019).

No que se refere a interleucina (IL) -6 é uma citocina com funções pleiotrópicas (do grego pleio = "muito" e tropo = "mudança") em diferentes tecidos e órgãos. Em especial, a IL-6 está associada à estimulação do

crescimento muscular hipertrófico e da miogênese por meio da regulação da capacidade proliferativa das células-tronco musculares. Efeitos benéficos adicionais da IL-6 incluem a regulação do metabolismo energético. Paradoxalmente, ações deletérias para a IL-6 também foram propostas, como promoção de atrofia e perda de massa muscular (KAMI; SENBA 1998; MUÑOZ-CANOVALES *et al.*, 2013).

Recentes estudos têm descrito que a IL-6 é definida como uma citocina anti-inflamatória que pode atuar como fator de crescimento visto sua capacidade de controlar as ações distintas das células satélites ao longo do processo miogênico (HODY *et al.*, 2019).

Estudos mostraram que IL-6 contribui para a regeneração muscular após lesão e isso pode envolver um efeito estimulante na proliferação de células satélites e ativação das vias citosólicas ligadas a sinalização insulínica, sendo possível que haja forte ligação na relação funcional entre células satélites e funções reparadoras. (HE *et al.*, 2018; KIDO *et al.*, 2016).

Apesar de haver fortes evidências nas ações autócrinas da IL-6, merece destacar que há infiltração de células inflamatórias que secretam outras citocinas modificando o microambiente local (SERRANO *et al.*, 2008; WAHL *et al.*, 2015).

A produção muscular esquelética e a liberação de IL-6 são reguladas tanto pela contração muscular quanto pela disponibilidade de substrato. Assim, quando o glicogênio muscular é baixo, é maior a produção de IL-6 e sua liberação durante o exercício. Esse achado é compatível com a ideia de que a IL-6 derivada do músculo funciona como um sensor de energia (PEDERSEN, 2012). De acordo, a disponibilidade aprimorada de glicose e a adaptação ao treinamento atenuam o aumento sensível ao exercício na concentração

plasmática de IL-6. A descoberta de que a IL-6 é liberada na corrente sanguínea durante o exercício e que essa liberação depende da disponibilidade de substrato durante o exercício, sugeriu que a IL-6 desempenha um papel na manutenção do *status* energético durante o exercício (WOLSK *et al.*, 2010).

Há evidências de que a IL-6 também atua regulando o metabolismo das células β pancreáticas e na secreção de insulina. Bouzakri *et al.* (2011) sugeriram a existência uma nova via de comunicação entre o músculo esquelético e as células β que é regulada pela resistência à insulina e poderia contribuir para a massa funcional normal das células β em indivíduos saudáveis, bem como em diabéticos, assim, a IL-6 medeia ações cruzada entre os tecidos sensíveis à insulina e as ilhotas pancreáticas.

É importante destacar os efeitos positivos da IL-6 e outras miocinas que estão normalmente associados à produção transitória, ação a curto prazo, no entanto, é consenso sua participação em dinâmicas de reparo frente ao desuso muscular. (WUNDERLICH *et al.*, 2010).

1.2 O Sinal Insulínico no Músculo Esquelético

As proteínas do substrato do receptor de insulina (IRS) são uma família de proteínas citoplasmáticas que integram e coordenam a transmissão de sinais do ambiente extracelular para o intracelular via receptores transmembrana, regulando assim o crescimento, metabolismo, sobrevivência e proliferação celular. As vias de sinalização PI3K / AKT / mTOR e MAPK são as vias de sinalização mais bem caracterizadas, ativadas pela sinalização IRS (vias canônicas). O substrato-1 do receptor de insulina (IRS1) e o substrato-2 do

receptor de insulina (IRS2) são as proteínas IRS mais bem caracterizadas em processos hematológicos (WHITE, 1998).

Quando fosforiladas, as proteínas IRS podem ligar a vários domínios contendo homologia Src (SH2) proteínas, incluindo PI3K, GRB2, SHP2, resultando na ativação de múltiplas vias de sinalização, especialmente o PI3K / AKT / mTOR e vias MAPK (KRYCER *et al.*, 2010).

A insulina também estimula a *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), que é uma via iniciada com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), proteína adaptadora envolvida na transdução de sinal (AKERSTROM *et al.*, 2014).

A GRB2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) da Ras (proteína liga a um gene ativador) ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da SHP2. Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em resíduo serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares. A insulina aumenta a síntese e bloqueia a degradação de proteínas através da ativação da mTOR (enzima alvo da rapamicina ligada ao anabolismo). A mTOR controla a translação de proteínas diretamente através da fosforilação da p70- ribossomal S6 quinase (p70^{sk}), que ativa a síntese ribossomal de proteínas através da fosforilação da proteína. A mTOR também fosforila a PHAS1 (enzima da via anabólica intracelular), que aumenta a síntese proteica via aumento da translação de proteínas (CROSS *et al.*, 1995).

Recentes publicações indicam que técnicas fisioterapêuticas, como treino de força muscular, tem a capacidade de atuar ativando as vias insulínicas citosólicas nas fibras musculares (FANG *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2017). Há de

se considerar que estes dados podem determinar uma nova abordagem no âmbito molecular que possa identificar as relações funcionais vinculados a prática fisioterapêutica.

1.3 Fotobiomodulação

Os Lasers e LEDs com diferentes doses de energia produzem determinados efeitos sobre os vasos sanguíneos da pele. Vários estudos seguem a fototerapia fundada na curva Básica de Arndt-Shultz como ideais para estimular a produção de células endoteliais e consequente angiogênese (AGAIBY et al., 2000; KIPSHIDZE et al., 2001, SCHINDL, 2003), além da produção de fibroblastos e colágeno (REDDY et al., 2001, PEREIRA et al., 2002; REDDY, 2003). Por outro lado, alguns autores justificam a utilização de fluências elevadas para fotobiomodular a cicatrização de feridas (AL-WATBAN et al., 1997; AL-WATBAN et al., 1999).

A fotobiomodulação induz efeitos fotoquímicos nas células por meio da absorção de luz. Este fenômeno, conhecido como terapia de fotobiomodulação, pode influenciar a atividade celular ou funções químicas e fisiológicas, promovendo alterações no metabolismo energético e aumentando a circulação colateral e a expressão gênica, segundo Huang *et al.* (2011). Além disso, a terapia de fotobiomodulação pode reduzir a inflamação e diminuir o estresse oxidativo, trazendo alguns benefícios relacionados aos músculos (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2015).

A literatura mostra os benefícios do uso da fototerapia em induzir processos fisiológicos celulares (NAMPO *et al.*, 2016). Estudos comparativos

entre Laser de baixa intensidade e LED tem descrito que o LED exige maiores dosagens para compensar a reflexão e a divergência da luz, entretanto mostram as vantagens dos LEDs que incluem a facilidade de uso doméstico, capacidade de irradiar uma grande área de tecido de uma só vez, e custo muito mais baixo por mW (HEISKANEN, HAMBLIN, 2018; PAOLILLO *et al.*, 2011).

Existe um consenso indicando que os eventos decorrentes da fotobiomodulação se fundamentam na capacidade das células absorverem a luz através de sistemas fotorreceptores (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2015).

Estes fotorreceptores, uma vez estimulados pela luz, promovem modificações na permeabilidade da membrana celular, nos sistemas transportadores transmembrânicos, e com isso geram expressivas mudanças na face intracelulares. Em suma, os fótons que penetram a membrana celular estimulam enzimas mitocondriais, tais como a citocromo C oxidase, promovendo aumento da produção de ATP de forma aeróbia (BORSA *et al.*, 2013). Concomitante a aplicação da fotobiomodulação observa-se ativação de uma cascata de sinalização intracelular com aumento da fosforilação da mTOR, diminuição da CK e de ROS, melhora da resistência da fadiga, entre outros (FERRARESI *et al.*, 2012; LEAL-JUNIOR *et al.*, 2015).

Especificamente, a citocromo C oxidase é uma enzima da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, onde 90% do oxigênio é reduzido atuando expressivamente na regulação do metabolismo aeróbio. Esta ação foi reiterada em modelo experimental onde uma única aplicação elevou a atividade da citocromo C oxidase (ALBUQUERQUE-PONTES *et al.*, 2015; HAYWORTH *et al.*, 2010).

Outro ponto a se considerar é que fotobiomodulação está associada a outros fatores, tais como o aumento da oxigenação tecidual e atividade morfofuncional mitocondrial e aumento na fosforilação da enzima AMPK (HUMBLIN, 2018).

No aspecto vascular, desenvolvido com animal de experimentação, foi descrito que a fototerapia promoveu uma potente vasodilatação arteriolar elevando o fluxo sanguíneo em aproximadamente 20% (BARONI *et al.*, 2010; MAEGAWA *et al.*, 2000).

Por sua vez, um estudo em humanos submetidos a FBM por LED demonstrou aumento da performance ao realizar um protocolo de fadiga do quadríceps, tal fato, pode ter relação com o melhor suprimento sanguíneo para o músculo (FERRARESI, 2012), estímulo da cadeia respiratória mitocondrial (BARNETT, 2006) aumento do *clearance* do ácido láctico (DE MARCHI *et al.*, 2012) e aumento da microcirculação.

Mediante o exposto levanta-se a seguinte questão: a fotobiomodulação com LED tem capacidade de reverter e/ou minimizar os efeitos deletérios do desuso muscular decorrente da imobilização?

1.4 Hipóteses

As hipóteses da presente tese são:

- O LED teria a capacidade de aumentar a secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas em diferentes concentrações de glicose.

- A fotobiomodulação com LED teria a capacidade de regular a homeostasia energética muscular e minimizar a ação de fatores deletérios às fibras musculares e aumentar a capacidade de resistência à tração.
- O aumento das miocinas e a diminuição sérica de citocinas inflamatórias poderiam ser otimizados pela fotobiomodulação com LED.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito da fotobiomodulação na secreção de insulina de ilhotas pancreáticas e no músculo esquelético imobilizado.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* se a FBM com LED modifica a resposta secretória de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos isoladas e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose.
- Avaliar em ratos o efeito da FBM com LED em músculos submetidos a imobilização nas condições metabólicas e na resistência à tração.
- Avaliar os efeitos da imobilização muscular nas reservas de glicogênio do músculo gastrocnêmio de ratos, a relação proteína/DNA (PT/DNA, indicativo da massa) e as concentrações plasmáticas das citocinas IL-6 e TNF- α .

1.6 Metodologias

A tese foi baseada em três estudos com a aplicação da fotobiomodulação por LED em diferentes situações, descritas a seguir:

1.6.1 Estudo I

Ação da Ledterapia na Secreção de Insulina em Ilhotas Pancreáticas

Isoladas de Ratos: Estudo *In Vitro*.

Grupos experimentais: Para avaliação da resposta secretória da insulina, ilhotas pancreáticas de ratos *Wistar* saudáveis pesando de 180-200g, obtidos no biotério da UNIMEP/Piracicaba, foram isoladas pelo método da colagenase. Para tal, os animais foram sacrificados por concussão cerebral e decapitados para sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no extremo distal junto ao duodeno e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno. Cerca de 8 ml de solução de Hanks contendo 8 mg de colagenase, foram injetados via cânula, provocando um fluxo retrógrado e a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi retirado, transferido para um tubo de ensaio (12x2cm) e incubado em banho maria por aproximadamente de 18 min a 37°C.

Em seguida, ainda em 37°C, o conteúdo do tubo foi agitado vigorosamente por um minuto e vertido em um Becker sendo misturado com solução de Hanks. O sobrenadante foi aspirado com seringa (50 ml) após decantação. A operação foi repetida por 3 vezes e o produto final foi transferido para placas de Petri, de onde, e sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

As ilhotas isoladas foram coletadas alternadamente, formando 2 grupos experimentais denominados controle e tratamento com LEDterapia (LED), logo após, foram transferidas para uma placa acrílica com poços medindo 0,7 mm/1cm de profundidade nos quais foram colocadas 5 ilhotas em cada poço e

preenchido com solução de Krebs contendo as seguintes concentrações de glicose: 2,8; 5,6; 8,3; 11,1 e 16,7 mmol/L. O tempo de incubação foi de 80 minutos.

Aplicação LED: O grupo de ilhotas tratadas com LED (BIOS THERAPY II, BIOS Indústria e Comércio de equipamentos médicos LTDA, CNPJ:08.957.047/0001-50), foi submetido a exposição da terapia na condição de emissão de 630nm, potência 500 mW e densidade de energia de 6 J/cm² aplicado em 4 sessões de 30s sequenciais a cada 20 minutos. Os parâmetros utilizados acompanharam a indicação presente no manual BIOS que acompanha o aparelho (Classificação Técnica Segundo ISO IEC 60601-2-57) e a dinâmica da incubação e estimulação das ilhotas (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros do LED utilizados no estudo I

Características	
Número de LEDs	104 (56 diodos de 660nm)
Modo de operação	Pulsado
Comprimento de onda	630nm ± 20nm
Potência	500 mW
Irradiância espectral	190 mW/cm ²
Frequência de disparo	50 Hz (±5%)
Intervalo de pulso	10 ms
Área de irradiação	1,76 cm ²
Densidade de energia	6 J/cm ²
Tempo de tratamento	120 s
Energia total	60 J

Determinação da concentração de insulina: Após o período de incubação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de pipeta de vidro afilada e acondicionado em *ependorf* sob gelo sendo prontamente transferido para o freezer onde permaneceu entre 7 e 10 dias. Posteriormente, a concentração de insulina no sobrenadante foi determinada pelo método ELISA (*enzyme linked*

immunosorbent assay, Linco Research TM, St Charles – MI, USA), expressa em ng/ilhota.

1.6.2 Estudo II

Ações da Led Terapia na Imobilização Muscular

Grupos experimentais: Foram utilizados ratos Wistar, com dois meses de idade (180-200 g/massa) obtidos do biotério da UNIMEP/Piracicaba. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura constante de 23 ± 2 °C e ciclo claro escuro controlado de 12 h e distribuídos em grupos experimentais com n=10 e assim denominados: Controle (C); Tratado com LEDterapia (LED); Imobilizado (I); Imobilizado tratado com LEDterapia (ILED).

Imobilização e Tratamento: A imobilização foi realizada no membro pélvico esquerdo utilizando uma órtese de resina acrílica, a qual manteve a articulação do tornozelo em posição de 90°, permitindo que as articulações do joelho e quadril permanecessem livres. No tratamento com LED, foi utilizado o aparelho BIOS THERAPY II (BIOS Indústria e Comércio de equipamentos médicos LTDA) de acordo com os parâmetros (630nm; 500 mW; 8 J/cm² equivalente a 30-40s). A aplicação da terapia foi pontual, por 7 dias consecutivos, na qual o feixe emitido incidia no ventre do músculo gastrocnêmio na posição de 90°, no intuito de otimizar a aplicação e acompanhando a indicação descrita no Manual BIOS (Tabela 2). A LED terapia foi aplicada através de uma janela de 0,9 x 0,9 cm aberta na órtese na região que corresponde ao ventre do músculo gastrocnêmio.

Tabela 2: Parâmetros do LED utilizados no estudo II

Características	
Número de LEDs	104 (56 diodos de 660nm)
Modo de operação	Pulsado
Comprimento de onda	630nm \pm 20nm
Potência	500 mW
Irradiância espectral	190 mW/cm ²
Frequência de disparo	50 Hz (\pm 5%)
Intervalo de pulso	10 ms
Área de irradiação	1,76 cm ²
Densidade de energia	8 J/cm ²
Tempo de tratamento	30-40 s
Energia total	15 a 20 J

Eutanásia e Coleta das amostras: Após o período experimental (8^o dia), os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg, intraperitoneal) e os músculos gastrocnêmio e sóleo do lado esquerdo foram coletados e separados. Para o teste de tensão foi utilizado o músculo gastrocnêmio (n=4 por grupo) e para as análises bioquímicas foram utilizados os músculos gastrocnêmio e sóleo (n=6 por grupo).

Teste de tensão: O teste de tensão foi realizado no dispositivo DL 2000-EMIC-Brasil da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNIMEP/SBO, onde o músculo gastrocnêmio foi mantido na posição longitudinal e a força de tração aplicada. Todas as amostras foram pré-tensionadas com 0,15 N e a velocidade estabelecida para o ensaio foi de 5 milímetros por minuto, com as medidas realizadas a cada 0,5 milímetro (LIMA et al., 2007) e expressas em Kgf.

Análise da concentração de glicogênio: Foram coletadas amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio e encaminhados para avaliação do conteúdo de glicogênio utilizando o método do fenol em meio ácido que consiste na digestão da amostra em KOH 30%, precipitação em etanol e colorimetria na presença de ácido sulfúrico. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol conforme método do fenol sulfúrico descrito por Lo, Russell e Taylor (1970). Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

Avaliação da concentração de proteínas e DNA: Na avaliação da concentração de proteínas foi utilizado o KIT Protal comercializado pela Labcenter® enquanto na avaliação do DNA foi utilizado o Kit de extração de DNA (MINI SPIN, KASVI) seguindo o cálculo de relação proteína total/DNA conforme KUGA *et al.* (2018).

1.6.3 Estudo III

Relações Metabólicas e Concentração de Miocinas na Terapia com Led:

Estudo em Músculos Imobilizados

Grupos Experimentais: Foram utilizados ratos albinos Wistar adquiridos da empresa ANILAB -Paulínia, SP. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, submetidos a ciclo foto periódico claro/escuro de 12h e mantidos em gaiolas coletivas (4 animais) à temperatura ambiente controlada em torno de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e distribuídos em grupos experimentais, com n=8 denominados: Controle (C); tratado com fototerapia com LED(T); Imobilizados (I) e imobilizados tratados com fototerapia com LED (IT).

Imobilização e Tratamento: Para imobilização foi utilizado o dispositivo de policloreto de vinil colocado no membro pélvico esquerdo mantendo a articulação do tornozelo na posição em 90° e deixando o quadril livre, cabe ressaltar que esta condição de desuso foi mantida por 7 dias (SILVA *et al.*, 2006). O aparelho de LED Bios Therapy II usado tem como características potência 300mW, comprimento de onda no vermelho 630nm e diâmetro de feixe 1,3 cm². A aplicação foi pontual por uma abertura realizada na resina que corresponde a região medial do músculo, por 60 segundos, com energia de 8 J/cm², repetido 3 vezes no mesmo ponto (Tabela 3). A aplicação do LED ocorreu duas vezes na semana, no 3º e no 6º dia da imobilização.

Tabela 3: Parâmetros do LED utilizados no estudo III

Características	
Número de LEDs	104 (56 diodos de 660nm)
Modo de operação	Pulsado
Comprimento de onda	630nm ± 20nm
Potência	300 mW
Irradiância espectral	114 mW/cm ²
Frequência de disparo	50 Hz (±5%)
Intervalo de pulso	10 ms
Área de irradiação	1,76 cm ²
Densidade de energia	8 J/cm ²
Tempo de tratamento	180 s
Energia total	54 J

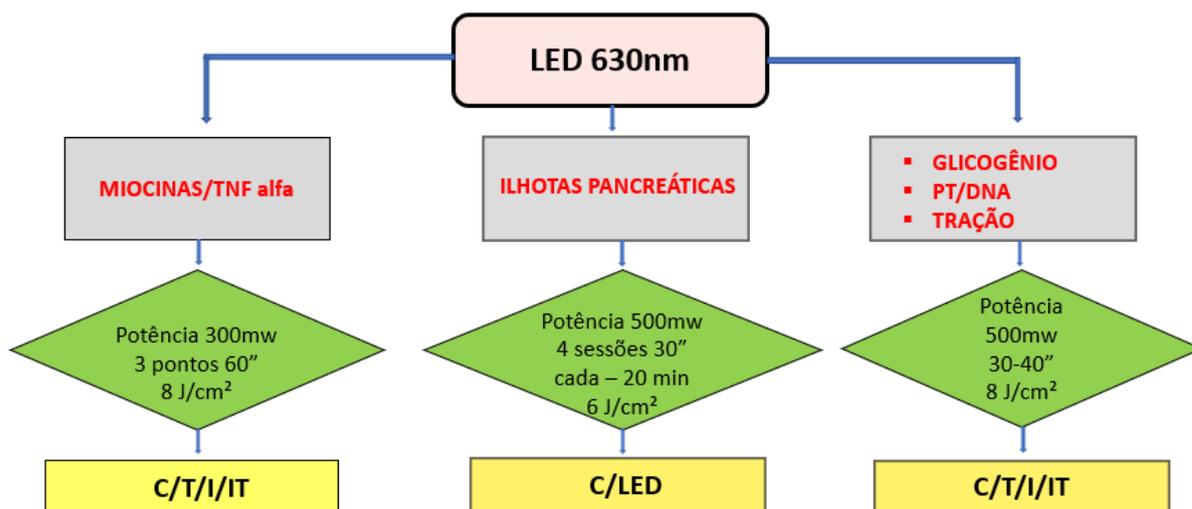
Eutanasia e Coleta das amostras: Após o período experimental (8º dia) os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg, intraperitoneal) e amostras de sangue foram coletados da veia femoral e acondicionados em *eppendorf*, estando os recipientes sob gelo, sendo prontamente centrifugado, também na condição de ambiente refrigerado e o plasma acondicionado em

freezer -70° para posterior avaliação das concentrações das interleucinas no dia seguinte a coleta.

Determinação das citocinas séricas: Foi utilizado os seguintes Kits de aplicação laboratorial, a saber: TNF (Monoclonal Anti-TNF antibody produced in mouse REF.000001 MARCA WH0007124M2 Sigma-Aldrich clone 1C3-A1-F4, purified immunoglobulin, buffered aqueous solution) e IL6 (I9646 Sigma-Aldrich REF.000001 MARCA Interleukin-6 from mouse). A seguir foram coletadas amostras do músculo gastrocnêmio para avaliação da concentração de glicogênio pelo método do fenol sulfúrico; proteínas e DNA através de Kit de aplicação laboratorial.

1.6.4 Desenho do estudo

Figura 1: Parâmetros utilizados nos estudos.



C – Controle; T – Tratado; I – Imobilizado; IT – Imobilizado tratado

SEGUNDA PARTE

DESENVOLVIMENTO

Estudo I: Ação da Ledterapia na Secreção de Insulina em Ilhotas Pancreáticas Isoladas de Ratos: Estudo *In Vitro*.

Aceite na revista Fisioterapia e Pesquisa em 09/07/2018 do manuscrito com ID FP-2017-0262.R2.

Estudo II: Ações da Led Terapia na Imobilização Muscular

Artigo publicado na Revista Eletrônica Acervo Saúde / Electronic Journal Collection Health, v.11, n. 9, e360.

DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e360.2019>.

Estudo III: Relações Metabólicas e Concentração de Miocinas na Terapia com Led: Estudo em Músculos Imobilizados

Publicado na revista SODEBRAS, v.14, n.163, p.15- 20, julho 2019.

DOI: <https://doi.org/10.29367/issn.1809-3957.14.2019.163.15>

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Estudo I

Ação da Ledterapia na Secreção de Insulina em Ilhotas Pancreáticas Isoladas de Ratos: Estudo *In Vitro*.

Aceite na revista Fisioterapia e Pesquisa em 09/07/2018 do manuscrito com ID FP-2017-0262.R2.

Eduardo de Latorre Fusatto, Carlos Alberto da Silva, Bruno Ferreira Gonçalves e Silva, Helena Amaral Gonçalves Fusatto e Marco Aurélio Serafim Bonvino.

Resumo

Introdução: A manutenção da normoglicemia depende da homeostasia nas dinâmicas funcionais do pâncreas endócrino, o qual apresenta ilhotas pancreáticas com população de células alfa e beta, secretoras de glucagon e insulina, sendo responsáveis por ajustar a disponibilidade de glicemia de acordo com a necessidade. Recentes estudos indicam os benefícios vinculados a aplicação de fototerapia com diodo emissor de luz (LED) indicando importantes aplicabilidades da terapia, dentre elas, sugere a possibilidade de minimizar as alterações glicêmicas geradas pelo diabetes. **Objetivo:** Avaliar *in vitro* se a LEDterapia modifica a resposta secretória de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose. **Material e Métodos:** Foi utilizado o pâncreas de ratos *Wistar* albinos divididos em 2 grupos experimentais denominados controle e tratado com LEDterapia (LED). As ilhotas foram isoladas pelo método da colagenase e incubadas em poços de acrílico sob banho aquecido a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ na presença de diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1 e 16,7 mmol/L) durante 80 minutos. Um grupo de ilhotas foram expostas a LEDterapia na condição de emissão de 630nm, potência 500 mw e densidade de energia de 6 j/cm^2 aplicado em 4 sessões de 30s sequenciais a cada 20 minutos. **Resultados:** O grupo LED apresentou aumento na secreção de insulina se comparado ao grupo controle em todas as condições com exceção da condição 2,8 mmol/L, que não é secretagoga. **Conclusão:** A LEDterapia aplicada em ilhotas isoladas (*in vitro*) promoveu aumento na secreção de insulina, potencializando o efeito gerado por concentrações crescentes de glicose.

Palavras Chave: LEDterapia, Secreção de Insulina, Ilhotas pancreáticas.

Introdução

A manutenção normoglicêmica é um processo integrado e multifuncional que envolve a associação do sistema nervoso autônomo com o sistema endócrino ^{1, 2, 3}.

Dentre os diferentes órgãos ligados ao controle glicêmico, o pâncreas endócrino merece especial atenção, visto que estruturalmente apresenta ilhotas pancreáticas, as quais contêm linhagens de células secretoras do hormônio hiperglicemiante glucagon e do hormônio hipoglicemiante insulina ^{4,5}. Uma patologia de grande interesse na comunidade científica mundial que merece destaque é o diabetes mellitus, na qual se observam expressivas alterações orgânicas vinculadas a falta da insulina ou redução na sensibilidade insulínica dos tecidos periféricos, condições que instigam a realização de estudos buscando contribuir para o entendimento do processo secretório da insulina⁵.

Com relação ao hormônio insulina, sabe-se que é secretado pelas células β pancreáticas cuja dinâmica estímulo-secreção ocorre inicialmente pela metabolização citosólica da glicose e concomitante elevação na relação ATP/ADP, promovendo o fechamento dos canais de potássio de baixa condutância (K_{ATP}), e conseqüente despolarização da membrana promovendo a abertura de canais de cálcio, influxo do cátion e extrusão dos grânulos de insulina ^{6, 7, 8}.

Além da glicose, que é o principal secretagogo, a atividade das células beta pancreáticas é modulada por neurotransmissores, hormônios peptídicos, vários nutrientes, aminoácidos como a leucina e arginina, ácidos graxos e cetoácidos, os quais potencializam a secreção de insulina ao atuar nos mecanismos primordiais representados pela redução na permeabilidade ao potássio e influxo de cálcio, propiciando a secreção da insulina ^{9, 10}.

A literatura tem apresentado recentes estudos indicando os benefícios vinculados a aplicação de fototerapia com diodo emissor de luz (LED) indicando importantes aplicabilidades da terapia^{11,12,13,14,15,16}. Mais especificamente tem sido ressaltado o uso da terapia em alterações geradas pelo diabetes ^{17, 18, 19}.

Recente estudo demonstrou que a terapia com LED foi capaz de modificar características morfofuncionais no pâncreas irradiado em modelo experimental de diabetes, e sugeriu que a LEDterapia pode ser uma técnica

coadjuvante que pode auxiliar na melhora do quadro gerado pelo diabetes e ainda, os autores demonstram que houveram modificações estruturais nas ilhotas pancreáticas após a LEDterapia²⁰.

Frente ao descrito acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* se a LEDterapia modifica a resposta secretória de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose.

Materiais e Métodos

Para avaliação da resposta secretória da insulina, ilhotas pancreáticas de ratos *Wistar* pesando de 180-200g foram isoladas pelo método da colagenase²¹. Para tal, os animais foram sacrificados por concussão cerebral e decapitados para sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no extremo distal junto ao duodeno e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno. Cerca de 8 ml de solução de Hanks contendo 8 mg de colagenase, foram injetados via cânula, provocando um fluxo retrógrado e a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi retirado, transferido para um tubo de ensaio (12x2cm) e incubado em banho maria por aproximadamente de 18 min a 37°C.

Em seguida, ainda em 37°C, o conteúdo do tubo foi agitado vigorosamente por um minuto e vertido em um Becker sendo misturado com solução de Hanks. O sobrenadante foi aspirado com seringa (50 ml) após decantação. A operação foi repetida por 3 vezes e o produto final foi transferido para placas de Petri, de onde, e sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

As ilhotas isoladas foram coletadas alternadamente, formando 2 grupos experimentais denominados controle e tratamento com LEDterapia (LED), logo após, foram transferidas para uma placa acrílica com poços medindo 0,7 mm/1cm de profundidade nos quais foram colocadas 5 ilhotas em cada poço e preenchido com solução de Krebs contendo as seguintes concentrações de glicose: 2,8; 5,6; 8,3; 11,1 e 16,7 mmol/L. O tempo de incubação foi de 80 minutos, sendo que o grupo de ilhotas tratadas com LED (BIOS THERAPY II, BIOS Indústria e Comércio de equipamentos médicos LTDA, CNPJ:08.957.047/0001-50), foi submetido a exposição da terapia na condição

de emissão de 630nm, potência 500 mW e densidade de energia de 6 j/cm² aplicado em 4 sessões de 30s sequenciais a cada 20 minutos. Os parâmetros utilizados acompanharam a indicação presente no manual BIOS que acompanha o aparelho e a dinâmica da incubação e estimulação das ilhotas estão representados na figura 1.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de pipeta de vidro afilada e acondicionado em *ependorf* sob gelo sendo prontamente transferido para o freezer onde permaneceu entre 7 e 10 dias. Posteriormente, a concentração de insulina no sobrenadante foi determinada pelo método ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*, Linco Research™, St Charles – MI, USA). A análise estatística foi realizada pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), seguido de ANOVA e teste de Tukey, sendo que em todos os cálculos foi fixado o nível crítico de 5%.

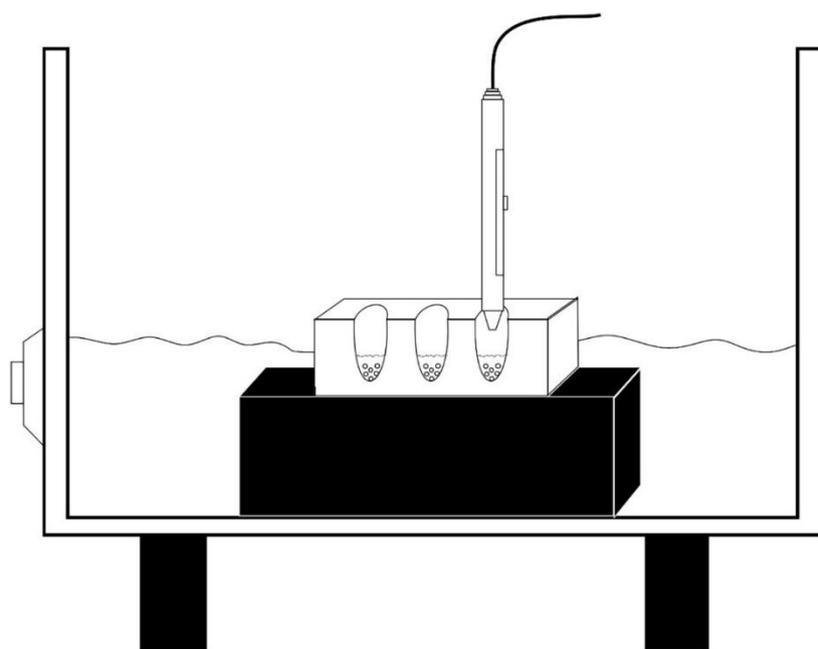


Figura 1. Sistema de incubação das ilhotas pancreáticas isoladas. As ilhotas permaneceram em poços sob banho aquecido a 37± 2°C e na presença de diferentes concentrações de glicose durante 80 minutos onde receberam o tratamento com LEDterapia (BIOS) na condição de emissão de 630nm, potência 500 mW e densidade de energia de 6 J/cm² aplicado em 4 sessões de 30s sequenciais a cada 20 minutos de acordo com a indicação contida no manual BIOS THERAPY II.

Resultados

Na avaliação da concentração de insulina presente no sobrenadante na presença de glicose 2,8mmol/L não foi observado diferença entre os grupos controle (C) e tratado com a LEDterapia (LED; BIOS THERAPY II), já nas ilhotas incubadas na presença de 5,6mmol/L de glicose foi observado valores 103% maiores se comparado ao grupo incubado na presença de 2,8 mmol/L não tratado e nesta condição, o grupo 5,6mmol/L tratado com LED apresentou elevação de 19% na concentração, se comparado ao grupo incubado na mesma concentração, porém, não tratado (figura 2).

A seguir foi avaliado o grupo de ilhotas incubadas na presença de 8,3mmol/L de glicose e foi observado valores 176% maiores se comparado ao grupo incubado na presença de 5,6 mmol/L de glicose. Nesta concentração, o tratamento com LED promoveu elevação de 23% no conteúdo de insulina e novamente diferindo do grupo não tratado.

A seguir, a mesma avaliação foi realizada no grupo de ilhotas incubadas na presença de 11,1 mmol/L de glicose e a concentração de insulina no meio foi 109% maior se comparado ao grupo 8,3 mmol/L, por sua vez, o grupo incubado na presença de 11,1 mmol/L de glicose e tratado com LED apresentou valores 22% maiores se comprado ao grupo não tratado (figura 2).

Por fim, foi avaliado o grupo de ilhotas incubadas na presença de 16,7mmol/L de glicose onde foi verificado elevação de 52% se comparado ao grupo de ilhotas incubadas na presença de 11,1 mmol/L e novamente a LEDterapia promoveu elevação de 31% na concentração de insulina no meio de incubação (figura 2).

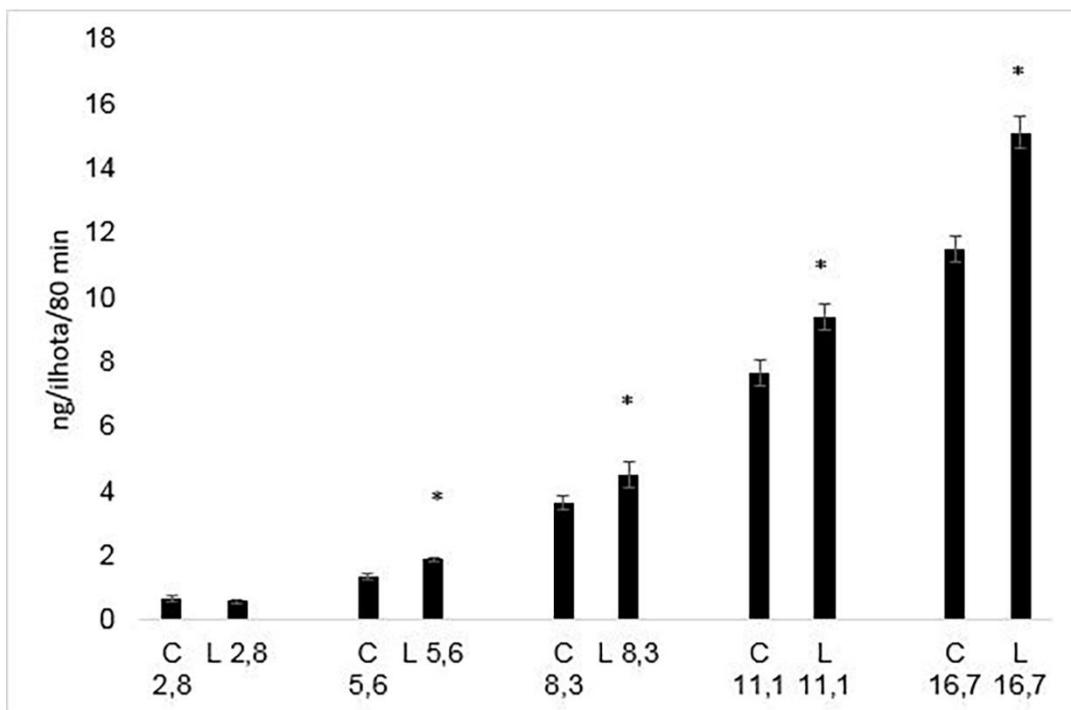


Figura 2. Concentração de insulina no meio de incubação contendo ilhotas pancreáticas isoladas de ratos do grupo controle (C) e tratado com LED (L, 6J/cm² aplicado em 4 sessões de 30s sequenciais com intervalo de 20min entre as aplicações totalizando 80 min). A incubação ocorreu na presença de diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1 e 16,7 mmol/L). Os valores estão expressos em ng/ilhota/80min, n=4. *P<0,05 comparado à mesma concentração controle.

Discussão

A literatura científica apresenta muitos fatores que regulam a secreção de insulina destacando hormônios, íons, vários fármacos, cofatores metabólicos e principalmente os nutrientes, como a glicose e alguns aminoácidos²³.

Com relação ao processo secretório da insulina, a glicose é o principal secretagogo, uma vez que, ao ser metabolizada gera mudanças do estado elétrico das células β culminando com extrusão dos grânulos de insulina^{24, 25}.

O processo biofísico gerador das alterações elétricas nas células beta é iniciado por mudanças na relação ATP/ADP e fechamento de canais de potássio²⁶. Neste sentido, este estudo mostra a resposta secretória frente à variação da glicemia, acompanhando as publicações que tradicionalmente relatam elevação na atividade secretória concomitante com a elevação na concentração glicêmica em que as células β das ilhotas pancreáticas são

expostas²⁷. Um dado importante é que a LEDterapia potencializou o fenômeno secretório de insulina induzido pela glicose, fato significativo e relevante ao se pensar na importância de potencializar tais respostas em condições que comprometem a homeostasia das células beta pancreáticas. Vale reiterar que quando ilhotas são expostas a glicose 2,8 mM classicamente não se observa secreção de insulina, por ser uma concentração abaixo do limiar de secreção e nesta condição a LEDterapia não interferiu no processo, sendo sugestivo que a terapia exerce ação potencializadora e não se comporta como secretagogo.

Alguns fármacos também apresentam ação enquanto secretagogo de insulina, destacando-se a tiazolidinedionas e as sulfoniluréias, substâncias que potencializam a atividade secretória das células beta pancreáticas^{28, 29}.

No recente estudo de Tatmatsu-Rocha et al.²⁰ foi sugerido que a LEDterapia altera a responsividade das células beta pancreáticas e pode ser um recurso coadjuvante na melhora das condições funcionais destas células, neste aspecto, este estudo *in vitro* ao demonstrar aumento na secreção de insulina na presença da LEDterapia, reitera a proposta dos autores supra-citados.

Importante salientar que existem dados na literatura indicando que a fototerapia acelera a síntese de ATP, sendo sugerido que o alvo da luz é enzima citocromo C oxidase mitocondrial, atuante na cadeia respiratória, assim, a fototerapia acelera a síntese de ATP via modulação da respiração celular. Cabe ressaltar, que o ATP gerado não atua somente no âmbito energético e pode ter relação com múltiplos efeitos em vias sinalizadoras que podem estar vinculados a LEDterapia³⁰.

Dentro de uma visão mais específica e vinculada ao aumento na atividade mitocondrial nas células β pancreáticas, sabe-se que a glicose após ser captada por transportador específico (tipo GLUT-2), a hexose é metabolizada até piruvato através da glicólise, entrando na mitocôndria onde é submetido ao ciclo de Krebs e após reações sequenciais elevam a síntese de ATP³¹. O aumento da relação ATP/ADP, promove o fechamento de um canal de K^+ sensível ao ATP (K_{ATP}), presente na membrana da célula β , levando a redução do efluxo de K^+ e concomitante despolarização da membrana que, por sua vez, provoca a abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, e influxo deste cátion e extrusão dos grânulos de insulina^{32, 33, 34}.

Neste contexto, possivelmente o tratamento com LED (*in vitro*) ao alterar a homeostasia funcional das mitocôndrias desencadeou mudança na relação ATP/ADP e este processo possa ser o evento que desencadeou aumento na secreção de insulina.

Com relação a secreção das citocinas, recentemente foi demonstrado em modelos experimentais de inflamação, que a LEDterapia promoveu aumento nas concentrações de IL-10, potente citocina anti-inflamatória que atua na redução das respostas pró-inflamatórias³⁵. Cabe ressaltar que a IL10 também possa ter sido produzida nas ilhotas tratadas com a LEDterapia e secundariamente possa proteger as células beta pancreáticas, no entanto, está proposta deve ser estudada com maior ênfase e cuidado, uma vez que se faz necessário adaptação da técnica visto a rápida degradação da interleucina.

Estudo experimentais têm sugerido a multiplicidade de mecanismos relacionados a fototerapia merecendo destaque a síntese de colágeno, proliferação de fibroblastos, angiogênese e redução na infiltração leucocitária^{36, 37, 38, 39, 40}. Dentre os muitos estudos experimentais, este estudo é pioneiro em demonstrar o efeito da LEDterapia *in vitro*, no entanto, reitera-se que estudos *in vivo* merecem atenção quanto a padronização dos parâmetros utilizados, pois não podem ser comparados com estudo *in vivo*²⁰, tendo em vista a presença de diferentes tecidos hierarquicamente localizados acima do tecido pancreático.

É sugestiva a proposta de se realizar outros estudos utilizando ilhotas isoladas de animais experimentais diabéticos ou cultura de ilhotas pancreáticas, buscando refinar o conhecimento e discernir sobre a real ação e importância da LEDterapia enquanto ferramenta que pode interferir no processo secretório de insulina.

Conclusão

A LEDterapia nos padrões utilizados neste estudo, quando aplicada em ilhotas pancreáticas isoladas (*in vitro*) promoveu aumento na secreção de insulina em concentrações crescentes de glicose, sugerindo ser uma terapia potencializadora do processo secretório.

Limitação do Estudo

Novos estudos se fazem necessário para dirimir aspectos inerentes a densidade de potência luminosa do LED em estudos realizados em meio de incubação, ou seja, na placa de irradiação com 1 cm de profundidade, condição não avaliada neste estudo.

Referências

- 1 - SILVERTHORN DE. Fisiologia Humana. 7ª edição, ARTMED, 2015.
- 2 - COSTANZO, L.S. Fisiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- 3 - MOLINA, J.; RODRIGUEZ-DIAZ, R.; FACHADO, A.; JACQUES-SILVA, M.C.; BERGGREN, P.O.; CAICEDO, A. Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet. *Diabetes*. 2014; 63(8):2417-26. doi: 10.2337/db13-1371.
- 4 - RAFF, H.; LEVITZKY, M. Fisiologia médica: uma abordagem integrada. Porto Alegre: AMGH, 2012. 800p. (Lange).
- 5 - HOANG, D.O.; THORN, P. Insulin secretion from beta cells within intact islets: location matters. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015; 42(4):406-14. doi: 10.1111/1440-1681.12368.
- 6 - VELASCO, M.; DÍAZ-GARCÍA, C.M.; LARQUÉ, C.; HIRIART, M. Modulation of ionic channels and insulin secretion by drugs and hormones in pancreatic beta cells. *Molecular pharmacology*. 2016; 90 (3): 341-357.
- 7 - RORSMAN, P.; RAMRACHEYA, R.; RORSMAN, N.J.; ZHANG, Q. ATP-regulated potassium channels and voltage-gated calcium channels in pancreatic alpha and beta cells: similar functions but reciprocal effects on secretion. *Diabetologia*. 2014; 57(9): 1749-1761. doi.org/10.1007/s00125-014-3279-8.
- 8 - PROKS, P.; PULJUNG, M.C.; VEDOVATO, N.; SACHSE, G.; MULVANEY, R.; ASHCROFT, F.M. Running out of time: the decline of channel activity and nucleotide activation in adenosine triphosphate-sensitive K-channels. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2016; 371(1700), 20150426. doi: 10.1098/rstb.2015.0426.
- 9 - LU, M.; LI, C. Nutrient sensing in pancreatic islets: lessons from congenital hyperinsulinism and monogenic diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1411(1):65-82. doi: 10.1111/nyas.
- 10 - RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:155-79. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183754.

- 11 - HIROMOTO, K.; KUSE, Y.; TSURUMA, K.; TADOKORO, N.; KANEKO, N.; SHIMAZAWA, M.; HARA, H. Colored lenses suppress blue light-emitting diode light-induced damage in photoreceptor-derived cells. *J Biomed Opt.* 2016;21(3):35004. doi: 10.1117/1.JBO.21.3.035004.
- 12 - TAN, Z.K.; MOGHADDAM, R.S.; LAI, M.L.; DOCAMPO, P.; HIGLER, R. DESCHLER, F.; HANUSCH, F. Bright light-emitting diodes based on organometal halide perovskite. *Nature nanotechnology.* 2014; 9 (9): 687-692. doi:10.1038/nnano.2014.149
- 13 - HELD G. Introduction to light emitting diode technology and applications. CRC Press, 2016. International Standard Book Number-13: 978-1-4200-7662-2.
- 14 - LEAL-JUNIOR, E.C.P.; VANIN, A.A.; MIRANDA, E.F.; DE CARVALHO, P.D.T.C.; DAL CORSO, S.; BJORDAL, J.M. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers in medical Science.* 2015; 30(2): 925-939. doi: 10.1007/s10103-013-1465-4.
- 15 - PARENTE, M.; DE PAULA, V.; CASALECHI, H.L.; VASCONCELLOS, M.; KAMIMURA, N.T.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. Analysis of the effect of LED (light emitting diode) therapy in traumatic tendinopathy in rats. *ConScientia e Saúde.* 2013; 12(1), 28 30. doi:10.5585.
- 16 - OPEL, D.R.; HAGSTROM, E.; PACE, A.K.; SISTO, K.; HIRANO-ALI, S.A.; DESAI, S.; SWAN, J. Light-emitting diodes: a brief review and clinical experience. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology.* 2015; 8(6), 36 -44.
- 17 - WU, X.; ALBERICO, S.; SAIDU, E.; RAHMAN KHAN, S.; ZHENG, S.; ROMERO, R.; ANDERS, J. Organic light emitting diode improves diabetic cutaneous wound healing in rats. *Wound Repair and Regeneration.* 2015; 23(1): 104-114. doi: 10.1111/wrr.12258.
- 18 - TCHANQUE-FOSSUO, C.N.; HO, D.; DAHLE, S.E.; KOO, E.; LI, C.S.; ISSEROFF, R.R.; JAGDEO, J. A systematic review of low-level light therapy for treatment of diabetic foot ulcer. *Wound Repair and Regeneration.* 2016; 24(2): 418-426. doi: 10.1111/wrr.12399.
- 19 - BARTCZAK, P.; FÄLT, P.; HAUTA-KASARI, M. Applicability of LED-based light sources for diabetic retinopathy detection in retinal imaging. *Computer-Based Medical Systems (CBMS), 2016 IEEE 29th International Symposium on.* IEEE, 2016.
- 20 - TATMATSU-ROCHA, J.C.; DE CASTRO, C.A.; SENE-FIORESE, M.; PARIZOTTO, N.A. Light-emitting diode modulates carbohydrate metabolism by pancreatic duct regeneration. *Lasers in Medical Science;* 2017; 1-9. DOI: 10.1007/s10103-017-2245-3.

- 21 - SPADELLA, C.T.; BREIM, L.C.; MERCADANTE, M.C.S.; MACEDO, C.S.D.; MACEDO, A.R.D. Transplante de ilhotas de Langerhans: estudo comparativo entre dois métodos diferentes de isolamento de ilhotas do pâncreas do rato. *Arq. Gastroenterol.* 1997; 34(1), 27-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502005000100008>
- 22 - FIÓRIO, F.B.; SILVEIRA, L.; MUNIN, E.; LIMA, C.J.; FERNANDES, K.P.S.; AGNELLI, R.; FERRARI, M. Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy.* 2011; 13 (6): 315-322. <https://doi.org/10.3109/14764172.2011.630082>.
- 23 - KALWAT, M.A.; COBB, M.H. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell. *Pharmacol Ther.* 2017; 17: 163-72. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.05.003
- 24 - VELASCO, M.; DÍAZ-GARCÍA, C.M.; LARQUÉ, C.; HIRIART, M. Modulation of Ionic Channels and Insulin Secretion by Drugs and Hormones in Pancreatic Beta Cells. *Mol Pharmacol.* 2016; 90(3):341-57. doi: 10.1124/mol.116.103861.
- 25 - HIVELIN, C.; BÉRAUD-DUFOUR, S.; DEVADER, C.; ABDERRAHMANI, A.; MORENO, S.; HAMID, M.M.A.; DJILLANI, A.; HEURTEAUX, C.; BORSOTTO, M.; MAZELLA, J.; COPPOLA, T. Potentiation of Calcium Influx and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell by the Specific TREK-1 Blocker Spadin. *Journal of Diabetes Research.* 2016; 1-9. doi: [10.1155/2016/3142175](https://doi.org/10.1155/2016/3142175).
- 26 - FELIX-MARTINEZ, G.J.; GODINEZ-FERNANDEZ, J.R. Mathematical models of electrical activity of the pancreatic β -cell: a physiological review. *Islets.* 2014; 6 (3): e949195. doi: 10.4161/19382014.2014.949195.
- 27 - BOSCHERO, A. C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. *Arq. Bras. Endocrinol Metab.* 1996; 40(3): 149-55.
- 28 - LOPES, V.P.; DOS SANTOS JÚNIOR, M.C.; JÚNIOR, A.D.F.S.; SANTANA, A.I.C. Farmacologia do diabetes mellitus tipo 2: antidiabéticos orais, insulina e inovações terapêuticas. *Revista Eletrônica de Farmácia.* 2012; 9(4): 22.
- 29 - ALVES DA CONCEIÇÃO, R.; NOGUEIRA DA SILVA, P.; BARBOSA, M.L.D.C. Fármacos para o Tratamento do Diabetes Tipo II: Uma Visita ao Passado e um Olhar para o Futuro. *Revista Virtual de Química.* 2016; 9 (2): 514-534. doi: 10.21577/1984-6835.20170030.
- 30 - KARU, T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2010; 28 (2): 159–160. doi: 10.1089/pho.2010.2789.
- 31 - QUESADA, I.; Tudurí, E.; Nadal, Á. (2007). Regulación por glucosa de la función de las células alfa, beta y delta en el islote de Langerhans. Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, 2007.

32 - HIRIART, M.; AGUILAR-BRYAN, L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic β - cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295: E1298-1306.; doi:10.1152/ajpendo.90493.2008.

33 - RORSMAN, P.; RAMRACHEYA, R.; RORSMAN, N.J.; ZHANG, Q. ATP-regulated potassium channels and voltage-gated calcium channels in pancreatic alpha and beta cells: similar functions but reciprocal effects on secretion. *Diabetologia.* 2014; 57(9): 1749-1761. doi: 10.1007/s00125-014-3279-8.

34 - VELASCO, M.; DÍAZ-GARCÍA, C.M.; LARQUÉ, C.; HIRIART, M. Modulation of ionic channels and insulin secretion by drugs and hormones in pancreatic beta cells. *Molecular pharmacology.* 2016; 90(3), 341-357. dx.doi.org/10.1124/mol.116.103861.

35 - MARTINS, D.F. Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. *Neuroscience.* 2016; 324: 485–495. doi: [10.1016/j.neuroscience.2016.03.035](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.035)

36 - KOMINE, N. Activation of the extracellular signal-regulated kinase signal pathway by light emitting diode irradiation. *Lasers in Medical Science.* 2010; 25 (4): 531–537. doi: [10.1007/s10103-009-0743-7](https://doi.org/10.1007/s10103-009-0743-7).

37 - XAVIER, M. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2010; 42(6): 553–558. doi: 10.1002/lsm.20896.

38 - ARUN KUMAR, M.; VENKATESH, D. Photobiomodulation, the physiological response of musculoskeletal system to low power lasers: a review. *Int J Cur Res Rev.* 2015; 7 (13): 1-4.

39 - MACEDO, A.B. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. *PloS One.* 2015; 10 (6): e0128567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128567>

40 - MOLINA, P.E. *Fisiologia endócrina.* 4. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 310 p. (Lange).

2.2 Estudo II

Ações da Led Terapia na Imobilização Muscular

Artigo publicado na Revista Eletrônica Acervo Saúde / Electronic Journal Collection Health, v.11, n. 9, e360. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e360.2019>.

Marco Aurélio Serafim Bonvino e Carlos Alberto da Silva.

Resumo

Objetivo: Analisar em ratos o efeito da LEDterapia em músculos submetidos a imobilização. **Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar de 2 meses de idade nos grupos experimentais: Controle (C), Imobilizados com órtese de resina acrílica (I; 7 dias), Controle tratados com LED (LED; 7 dias de aplicação; 630nm; 500 mW; 8-10 J/cm² equivalente a 30-40s) e imobilizados tratados com LED (ILED; n=6 grupo). Avaliações realizadas: teste de tração (com foco no gastrocnêmio, n=4/grupo), conteúdo muscular de glicogênio (GLI) e relação proteína total/DNA (PT/DNA) dos músculos sóleo e gastrocnêmio. **Resultados:** Mostraram que o grupo LED não diferiu do C quanto as GLI, PT/DNA nem as respostas frente ao teste de tração. Os músculos do grupo I resistiram menos a tração e ainda apresentaram menores GLI e PT/DNA indicando atrofia, por sua vez, no grupo ILED as condições GLI e PT/DNA foram significativamente melhores se comparado ao I e ainda apresentaram maior resistência no teste de tração se comparado ao I não tratado. **Conclusão:** A LEDterapia propiciou melhores condições energéticas e possivelmente estruturais, minimizando eventos da imobilização.

Palavras-chave: imobilização, músculo esquelético, fisioterapia.

Introdução

A atrofia do músculo esquelético, gerada pelo desuso, se caracteriza pela redução na massa muscular em decorrência de expressivas mudanças fisiológicas e morfológicas, neste sentido, entender os mecanismos envolvidos neste processo é importante para desenvolver protocolos que minimizem tais alterações e/ou auxiliem na preservação de funções fisiológica (WALL BT *et al.*, 2013; WALL *et al.*, 2014). Entre pesquisadores há o consenso que as alterações mais significativas ocorrem nos primeiros 7 dias do desuso, onde o conjunto de modificações histofisiológicas decorre do desequilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas miofibrilares, redução na eficiência das vias citosólicas reguladoras do metabolismo e disfunções mitocondriais (LIMA *et al.*, 20017; HUGHES *et al.*, 2017; MIRZOEV TM e SHENKMAN BS, 2018).

Procedimentos fisioterapêuticos, tal como a fotobioestimulação, são utilizados no intuito de estimular o restabelecimento de funções orgânicas, neste contexto, tem sido destacado as múltiplas ações inerentes a LEDterapia quer seja estimulando o processo de cicatrização de feridas ou até minimizando a degeneração do nervo óptico lesionado (GIACCI MK, 2014). No que se refere ao mecanismo de ação da LEDterapia há descrições relatando seu potencial para estimular o citocromo C mitocondrial aumentando o consumo de oxigênio e a produção de ATP, promovendo redução na efetividade das vias deflagradas por inflamação além de promover aumento na expressão de genes que modulam a formação de citocinas anti-inflamatórias (CAMARGO *et al.*, 2012). Além destas, tem sido observado alterações significativas na proliferação celular, diferenciação celular ou produção de colágeno (OPEL DR *et al.*, 2015).

Diante disso, o objetivo foi avaliar as ações ligadas a LEDterapia na condição de imobilização tendo como eixo norteador as reservas musculares de glicogênio, a relação proteína total/DNA e o teste de tensão máxima deformação, condições impar para a recuperação funcional do músculo após o desuso.

Material e Métodos

Animais experimentais: Foram utilizados ratos Wistar, com 2 meses de idade (180-200g/massa) obtidos do biotério da UNIMEP/Piracicaba. Os animais

foram alimentados com ração e água *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura constante de 23 ± 2 °C e ciclo claro escuro controlado de 12 h. Os animais foram distribuídos em grupos experimentais com N=6/grupo e assim denominados: Controle (C); Tratado com LEDterapia (LED); Imobilizado (I); Imobilizado tratado com LEDterapia (ILED). **Teste de tensão:** O teste de tensão foi realizado no dispositivo DL 2000-EMIC-Brasil da faculdade de engenharia mecânica da UNIMEP, onde o músculo gastrocnêmio foi mantido na posição longitudinal e a força de tração aplicada, garantindo com isto o máximo da aplicação da força e sequencialmente o padrão registrado. (figura 1C). **Imobilização:** A imobilização foi realizada utilizando uma órtese de resina acrílica, a qual manteve a articulação do tornozelo em posição de 90°, permitindo que as articulações do joelho e quadril permanecessem livres (figura 1A). No tratamento com LED, foi utilizado o aparelho BIOS THERAPY II (BIOS Indústria e Comércio de equipamentos médicos LTDA) de acordo com os parâmetros (7 dias de aplicação; 630nm; 500 mW; 8-10 J/cm² equivalente a 30-40s). A aplicação da terapia foi pontual, na qual o feixe emitido incidia no ventre do gastrocnêmio na posição de 90° no intuito de otimizar a aplicação e acompanhando a indicação descrita no MANUAL BIOS (figura 1 B). A LED terapia foi aplicada através de uma janela de 0,9x0,9cm aberta na região que corresponde ao ventre do músculo gastrocnêmio (figura 1B). **Análise da concentração de glicogênio:** Foram coletadas amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio e encaminhados para avaliação do conteúdo de glicogênio utilizando o método do fenol em meio ácido que consiste na digestão da amostra em KOH 30%, precipitação em etanol e colorimetria na presença de ácido sulfúrico (SIU LO, 1970). **Avaliação da concentração de proteínas e DNA.** Na avaliação da concentração de proteínas foi utilizado o KIT Protal comercializado pela Labcenter enquanto na avaliação do DNA foi utilizado o Kit de extração de DNA (MINI SPIN, KASVI) seguindo o cálculo de relação proteína total/DNA conforme KUGA *et al.*, (2018). A análise estatística dos dados foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e nas amostras que expressaram normalidade foi utilizado ANOVA *two way* seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal protocolo: 09/2018.

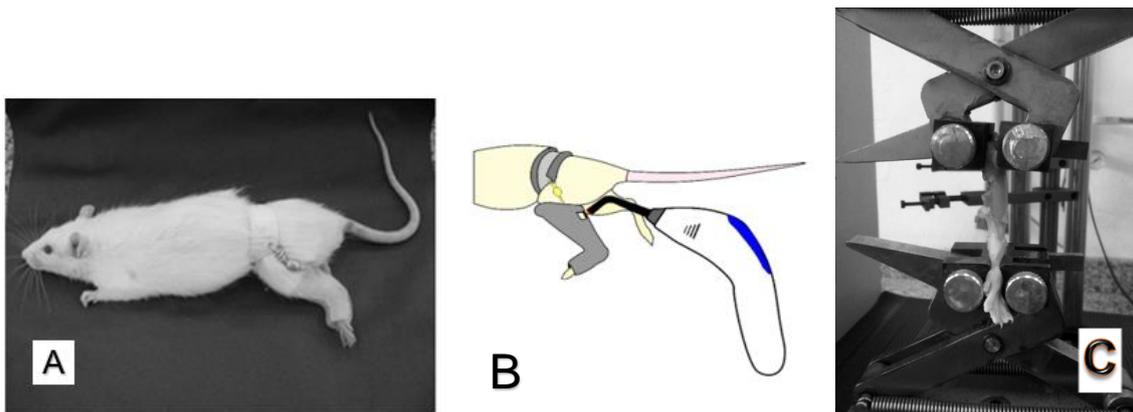


Figura 1. Órtese de resina acrílica aplicada no membro pélvico do animal (A) e esquema representativo do procedimento de aplicação da LEDterapia (B). Em C dispositivo DL 2000-EMIC-Brasil usado no teste de tração.

Resultados

O procedimento de imobilização utilizado para induzir o desuso foi eficiente em promover redução nas reservas glicogênicas representado por valores 53% e 46%, respectivamente menores ao analisar o músculo sóleo (S) e o gastrocnêmio (G). Dentro deste mesmo perfil de análise foi verificado que a terapia com LED não influenciou nas reservas glicogênicas tanto no músculo S quanto no G na condição de normalidade, no entanto, quando a LEDterapia foi aplicada no grupo imobilizado (I) foi observado reservas 28% e 44% maiores se comparado ao grupo I não tratado. Mesmo havendo uma ação significativa da LEDterapia nas condições metabólicas dos músculos imobilizados, as reservas ainda permaneceram 27% menores se comparados ao controle. (Figura 2).

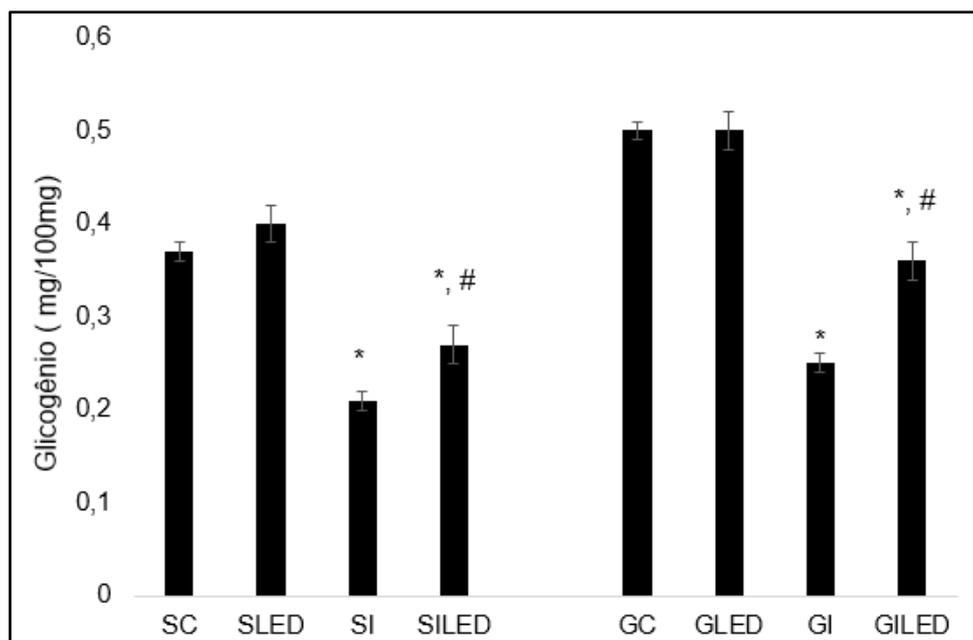


Figura 2. Concentração de glicogênio (mg/100mg) nos músculos sóleo (S) e gastrocnêmio (G) dos grupos controle (C), tratados com LEDterapia (LED), imobilizados (I) e imobilizados tratados com LEDterapia (ILED). Os valores correspondem a média \pm dp, n=6. *p<0,05 comparado ao C e #p<0,05 comparado ao I.

A análise da concentração de proteínas (CP) nos músculos S e G tratados com LEDterapia (LED) não demonstrou diferença estatística se comparado a condição C, por outro lado, em decorrência da imobilização (I) houve redução de 34% na CP no S e 58% no G, condição que foi minimizada no grupo ILED, onde as CP do S foram 20% maiores do que o grupo I, enquanto no G foram 14% maiores, porém, ainda permaneceram 22% e 27% abaixo dos valores observados no grupo C, respectivamente aos músculos S e G. (figura 3 A).

Nos mesmos grupos experimentais foram avaliadas as concentrações de DNA (cDNA) no S e G, e de forma similar ao descrito na CP, os grupos C e LED não diferiram, no entanto, condição diferenciada foi verificada no grupo I onde a cDNA foi 43% menor no S e 74% no G se comparados ao C, fato que ocorreu em menor intensidade no grupo ILED onde a cDNA apresentou valores 100% maiores no S e 33% no G, se comparado a condição I, porém, ainda 14% e 60% respectivamente menores se comparado a condição C. (figura 3 B).

Após a determinação da CP muscular e a cDNA, faz-se necessário determinar a relação entre o número e o tamanho dos miócitos, para tal, foi determinado a razão proteína/DNA (PT/DNA) não sendo observado no músculo

S ou G diferença entre C e LED, no entanto, no grupo I houve redução de 50% na PT/DNA do S e 42% no G, se comparado ao C. Cabe ressaltar que no grupo ILED, a PT/DNA foi 14% maior no S e 28,5% no G se comparado ao I e 36% no S e 18% menor no G, respectivamente se comparado ao C. (figura 4).

Por fim, foi aplicado o teste de tensão máxima (TM) com foco no músculo gastrocnêmio, estando os valores expressos em Kgf. Foi observado que a LEDterapia não influenciou em parâmetros que indicassem mudança na resposta a TM, uma vez que o grupo C não diferenciou de LED. Nos músculos imobilizados a resposta a TM foi 52% menor se comparado ao C e no grupo ILED, a resposta frente ao teste de TM foi 43% maior se comparado ao I e 31% menor que C. (figura 5).

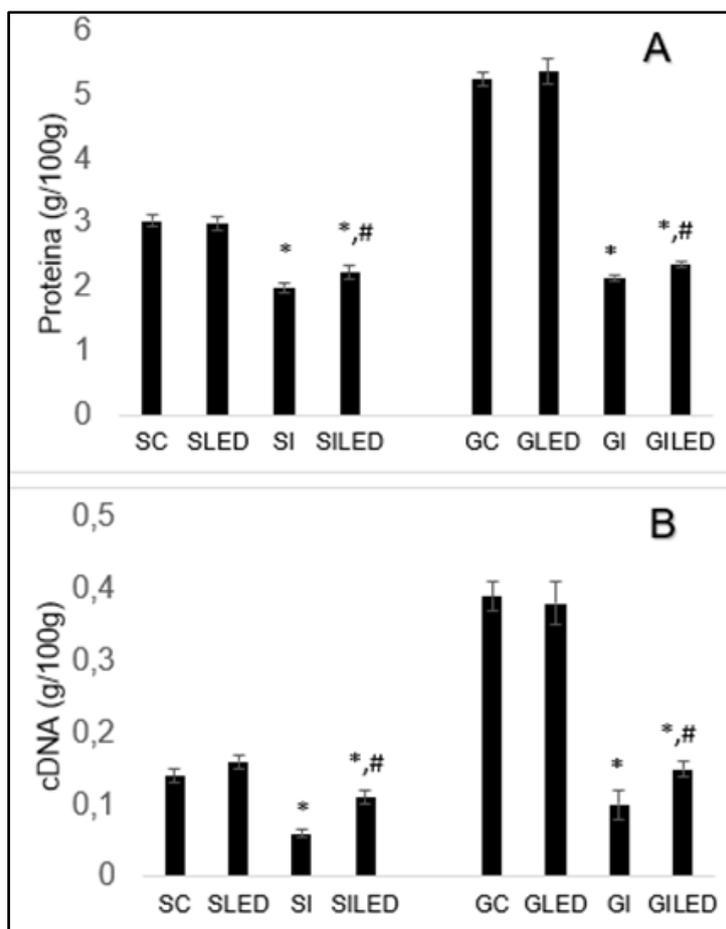


Figura 3. Em **A**, concentração de proteína (g/100g) e em **B**, concentração de DNA (cDNA; g/100g) dos músculos sóleo (S) e gastrocnêmio (G) dos grupos controle C, tratados com LEDterapia (LED), imobilizados (I) e imobilizados tratados com LEDterapia (ILED). Os valores correspondem a média \pm dp, n=6. * $p < 0,05$ comparado ao C e # $p < 0,05$ comparado ao I.

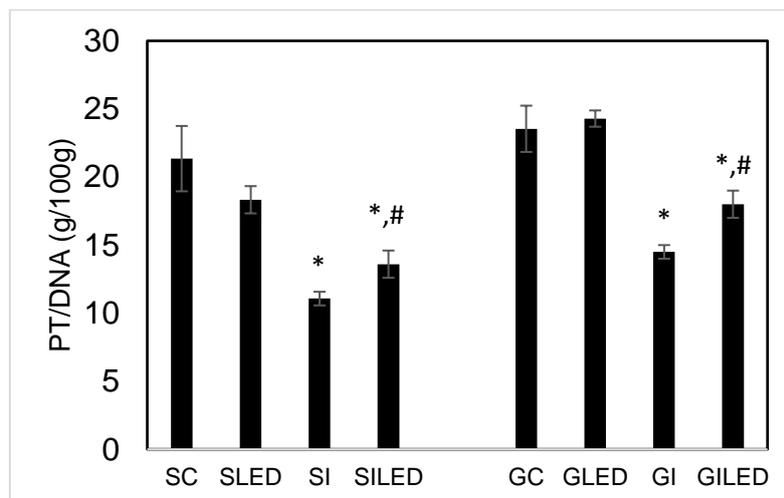


Figura 4. Relação proteína/DNA (PT/DNA; g/100g) dos músculos sóleo (S) e gastrocnêmio (G) dos grupos controle C, tratados com LEDterapia (LED), imobilizados (I) e imobilizados tratados com LEDterapia (ILED). Os valores correspondem a média \pm dp, n=6. * $p < 0,05$ comparado ao C e # $p < 0,05$ comparado ao I.

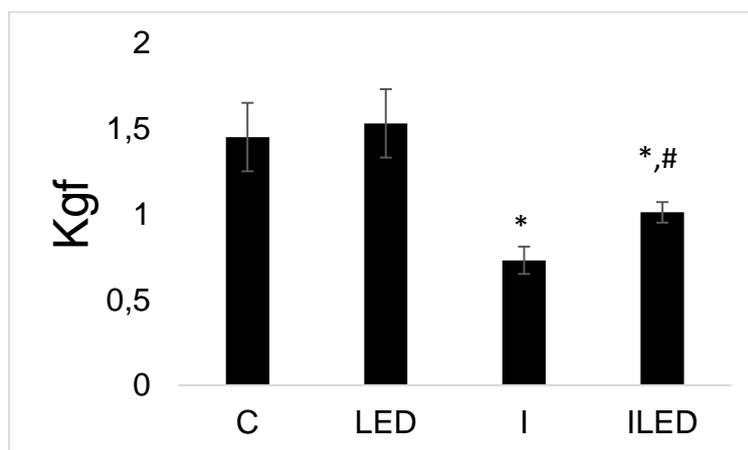


Figura 5. Teste de tensão máxima (Kgf) no músculo gastrocnêmio dos grupos controle (C), tratados com LEDterapia (LED), imobilizados (I) e imobilizados tratados com LEDterapia (ILED). Os valores correspondem a média \pm dp, n=4. * $p < 0,05$ comparado ao C e # $p < 0,05$ comparado ao I.

Discussão

Avaliações ligadas ao desuso muscular crônico induzido pela imobilização e o processo de atrofia tem demonstrado que no período agudo de 7 dias, já se observa resistência à insulina comprometendo o controle da homeostasia metabólica das fibras musculares, bem como a funcionalidade do tecido muscular (SCHIAFFINO S *et al.*, 1013). Os dados aqui apresentados indicam

que devido ao desuso houve redução expressiva nas reservas glicogênicas tanto nas fibras tipo I quanto nas fibras tipo II, com maior intensidade nas fibras tipo I (KASPER CE *et al.*, 2002).

Tem sido consenso em diversos estudos que na fase aguda da imobilização muscular (7 dias) há redução nas reservas energéticas e na expressão das proteínas AKT e IRS-1, evidenciando comprometimento na eficiência da sinalização insulínica (KOIKE TE *et al.*, 2018). Os dados aqui apresentados ao demonstrar redução nas reservas glicogênicas e na relação proteína/DNA, reforçam a amplitude dos processos desencadeados que culminam com a atrofia.

Cientistas tem utilizado fototerapia com LED em diferentes protocolos de tratamento, fundamentado no fato da capacidade da luz em ativar processos fisiológicos celulares (PAOLILLO FR *et al.*, 2011; HYATT H *et al.*, 2018). Uma hipótese aceita indica que as células apresentam sistemas receptores sensíveis aos fótons, e estes, uma vez estimulados pela luz, promovem modificações na permeabilidade da membrana celular, nos sistemas transportadores transmembrânicos além de estimular enzimas mitocondriais, tais como a citocromo oxidase, promovendo aumento da produção de ATP (BORSA PA *et al.*, 2013; DE FREITAS LF e HAMBLIN MR, 2016).

Os dados aqui apresentados demonstram que na condição de normalidade a LEDterapia não promoveu modificação nos parâmetros reservas glicogênicas, proteínas teciduais, quantidade de DNA, nem na relação proteína/DNA, possivelmente na condição de normalidade, onde os sistemas fisiológicos estão íntegros, a maior sensibilidade os sistemas reguladores neurais ou endócrinos, podem ser primários no controle da homeostasia. Ao analisarmos o mesmo perfil em músculos imobilizados foi verificado que a LEDterapia minimizou as alterações geradas pela imobilização, uma vez que, os grupos tratados apresentaram significativamente melhores no aspecto metabólico e estrutural se comparado ao grupo imobilizado não tratado.

Estudos demonstraram que a LEDterapia ao exercer potente ação vasodilatadora arteriolar eleva o fluxo sanguíneo no local da aplicação, condição que contrapõe a redução na capilarização já descrita no desuso, permitindo com isso o maior oferecimento de substratos metabolizáveis as fibras musculares em

desuso (KARU T, 2010). Importante estudo com atletas submetidos a LEDterapia demonstrou aumento na performance ao realizar um protocolo de fadiga do quadríceps, tal fato, pode ter relação com o melhor suprimento sanguíneo para o músculo e estímulo da cadeia respiratória mitocondrial, assim, estes fatores associados podem ter contribuído para as melhores condições observadas nos músculos imobilizados tratados e apresentados neste estudo (KARU T, 2010).

Estudos experimentais têm descrito que músculos submetidos a imobilização apresentam redução na síntese do colágeno, quantidade de água e glicosaminoglicano, o que torna a fibra muscular menos elástica (TIMMER LT, 2018). Estes estudos justificam nossos resultados que demonstram menor resposta ao teste de tensão apresentado no músculo submetido a imobilização.

Análises histológicas e histomorfométricas demonstraram que o tratamento com LED durante 7 dias, promove aumento qualitativo e quantitativo no número de fibroblastos já aos sete dias de tratamento, propiciando com isso aumento no conteúdo de colágeno tecidual (JAGDEO J *et al.*, 2018). Cabe destacar que, esta ação pode ter permitido a maior resistência a tração no músculo imobilizado sendo o tratamento significativo para minimizar as alterações morfofuncionais geradas pelo desuso.

Conclusão

O tratamento de músculos imobilizados com LED foi efetivo em minimizar a redução nas reservas glicogênicas, bem como propiciou a manutenção da relação proteína/DNA, fatores primordiais para a melhora na resposta frente as exigências oferecidas quando submetido a tensão e estes dados demonstram a importância e a versatilidade da aplicação do LED.

Referências

CAMARGO, M.Z.; SIQUEIRA, C.P.C.M.; PRETI, M.C.P.; NAKAMURA, F.Y.; LIMA, F.M.; DIAS, I.F.L.; RAMOS, S.P. Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscle damage in rats. *Lasers in Medical Science*. v.27, n.5, p.1051–1058, 2012.

DE FREITAS, L.F.; HAMBLIN, M.R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.*, v.22, n.3, p.17-20, 2016.

GIACCI, M.K., et al. Differential effects of 670 and 830 nm red near infrared irradiation therapy: a comparative study of optic nerve injury, retinal degeneration, traumatic brain and spinal cord injury. *PLoS One.*, v.8, e104565, 2014.

HYATT, H., et al. Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: A review of the causes and effects. *Arch Biochem Biophys.*, v.662: p.49-60, 2018.

HUGHES, D.C.; MARCOTTE, G.R.; MARSHALL, A.G.; WEST, D.W.D.; BAEHR, L.M.; WALLACE, M.A. Age-related differences in dystrophin: impact on force transfer proteins, membrane integrity, and neuromuscular junction stability. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, v. 72, p.640–648, 2017.

JAGDEO, J., et al. Light-Emitting Diodes in Dermatology: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Lasers in Surgery and Medicine.*, v.12, p. 1–16, 2018.

KASPER, C.E., et al. Skeletal muscle damage and recovery. *AACN Clin Issues.* v.13, n.2, p.237-47, 2002.

KOIKE, T.E., et al. Exercício físico após imobilização de músculo esquelético de ratos adultos e idosos. *Rev Bras Med Esporte [online].* v. 24, n.1, p. 60-63, 2018.

KARU, T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg.* v.28,n.2, p.159-60, 2010.

KUGA, G.K.; GASPAR, R.C.; MUÑOZ, V.R.; NAKANDAKARI, S.C.B.R.; BREDA, L.; SANDOVAL, B.M.; CAETANO, F.H.; JACA, L.; PAULI, JR; GOMES, R.J. Physical training reverses changes in hepatic mitochondrial diameter of Alloxan-induced diabetic rats. *Einstein (São Paulo).* v.16, n.3: p.1-8, 2018.

LIMA, S.C., et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfológicas e mecânicas no músculo de rato. *Rev. Bras. Fisioter.*, v.11, n.4, p.297-302, 2007.

MIRZOEV, T.M.; SHENKMAN, B.S. Regulation of Protein Synthesis in Inactivated Skeletal Muscle: Signal Inputs, Protein Kinase Cascades, and Ribosome Biogenesis. *Biochemistry (Mosc).*, v.83, n.11, 1299-1317, 2018.

OPEL, D.R., et al. Light-emitting diodes: A brief review and clinical experience. *J Clin aesthetic Dermatol.* v.8, n.6, p.32-36, 2015.

SCHIAFFINO, S., et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* v.280, n.17, p.4294-314, 2013.

TIMMER, L.T. et al. The Role of IGF-1 Signaling in Skeletal Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol.*, v. 1088, p.109-137, 2018.

WALL, B.T. et al. Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia., v.12, n.4, p.98-906, 2013.

WALL, B.T.; DIRKS, M.L.; SNIJDERS, T.; SENDEN, J.M.; DOLMANS, J.; VAN LOON, L.J. Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta physiologica.*, v.210, n.3, p.600–11, 2014.

2.3 Estudo III

Relações Metabólicas e Concentração de Miocinas na Terapia com Led: Estudo em Músculos Imobilizados

Publicado na revista SODEBRAS, v.14, n.163, p.15- 20, julho 2019.

DOI: <https://doi.org/10.29367/issn.1809-3957.14.2019.163.15>

Marco Aurélio Serafim Bonvino; Bruno Ferreira Gonçalves e Silva; Alexandre Reis Taveira de Souza; Carlos Alberto Da Silva; Adriana Pertille.

RESUMO

Fundamentado nos benefícios da fototerapia com LED foram estudados em animais submetidos a imobilização muscular os seguintes parâmetros: reservas de glicogênio do músculo gastrocnêmio, a relação proteína/DNA (PT/DNA, indicativo da massa) e as concentrações plasmáticas das citocinas, IL-6, e TNF- α após 7 sessões. Os métodos utilizados fazem parte das rotinas laboratoriais e são suficientes para avaliar condições fisiológicas e homeostasia metabólica, sendo o estudo autorizado pela CEUA/UNIMEP. Nos resultados foi verificado que a imobilização comprometeu as reservas glicogênicas e promoveu perda de massa, condição explícita na diminuição da relação PT/DNA, além de induzir elevação na concentração plasmática de TNF- α (citocina inflamatória), por sua vez, na condição imobilizado tratado com fototerapia com LED foi observado melhora nos parâmetros metabólicos e na massa acompanhado de redução na citocina inflamatória. Como conclusão sugere-se que os benefícios da fototerapia com LED indicam que pode ser coadjuvante de tratamentos que busquem melhorar as condições químio metabólicas de músculos submetidos ao desuso.

Palavras-chave: Terapia com LED.IL-6, TNF- α .

Introdução

A imobilização de músculos esqueléticos é uma condição que induz múltiplos eventos deletérios, tais como redução na sensibilidade insulínica e nas reservas energéticas, disfunções mitocondriais e aumento na proteólise, fatores associados que predispõe a atrofia (JACKMAN e KANDARIAN, 2004;

CARVALHO *et al.*2013). Recentes estudos têm descrito grande comprometimento mitocondrial quando o músculo é colocado em desuso (HYATT *et al.*,2019; GORGEY *et al.*,2019). Dentro de um perfil temporal tem sido descrito que a redução na síntese proteica nos músculos dos membros imobilizados já ocorre nas primeiras 6 horas de imobilização e se agrava até o sétimo dia (MALLINSON e MURTON,2013). Diferentes pesquisadores tem se dedicado ao estudo de modelos experimentais que promovem o desuso muscular na posição de alongamento ou encurtamento, no entanto, o modelo de órtese de resina acrílica é o único que mantém o tornozelo a 90° gerando encurtamento nos músculos posteriores do membro pélvico, porém, deixando o quadril livre(MARZUCA-NASSR *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2006). A literatura tem destacado a multiplicidade de ações das citocinas em muitos tecidos, tais como no sistema imunológico, no tecido adiposo bem como no tecido muscular (JUNIOR *et al.*, 2015). Neste sentido, tem sido descrito que concomitante ao aumento no tempo de ativação da musculatura, há secreção de citocinas tais como a IL-6, a qual atua enquanto agente que promove a mobilização de reservas energéticas hepáticas e adiposas provendo o músculo de substratos metabolizáveis, por sua vez, em condições de desuso há um desequilíbrio entre diferentes citocinas intensificando a liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e propiciando o desenvolvimento de atrofia (JUNIOR *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2014).

Dentre as terapias atualmente em destaque, temos a fototerapia com LED (light emitting diode – diodo emissor de luz). Estudos tem descrito que a LEDterapia está associada com aceleração no processo de cicatrização de feridas na pele, melhora na recuperação de lesão por isquemia no coração e até atenuação na degeneração do nervo óptico lesionado (SERAFIM *et al.*, 2012; HEMMINGS *et al.*, 2017). Atribuem-se parte dos efeitos do LED à estimulação na função mitocondrial, neste contexto, estudos *in vitro* e *in vivo*, sugeriram que o LED é capaz de estimular as funções mitocondriais por aumentar o consumo de oxigênio, a produção de ATP, o transporte de elétrons e por promover redução na formação de espécies reativas do oxigênio e ainda minimizar reações inflamatórias, possivelmente por interferir na geração/ação da citocina TNF α . Esses efeitos parecem ser mediados pelo aumento da expressão de genes que modulam a atividade antioxidante e coordenam ações anti-inflamatórias (LEAL

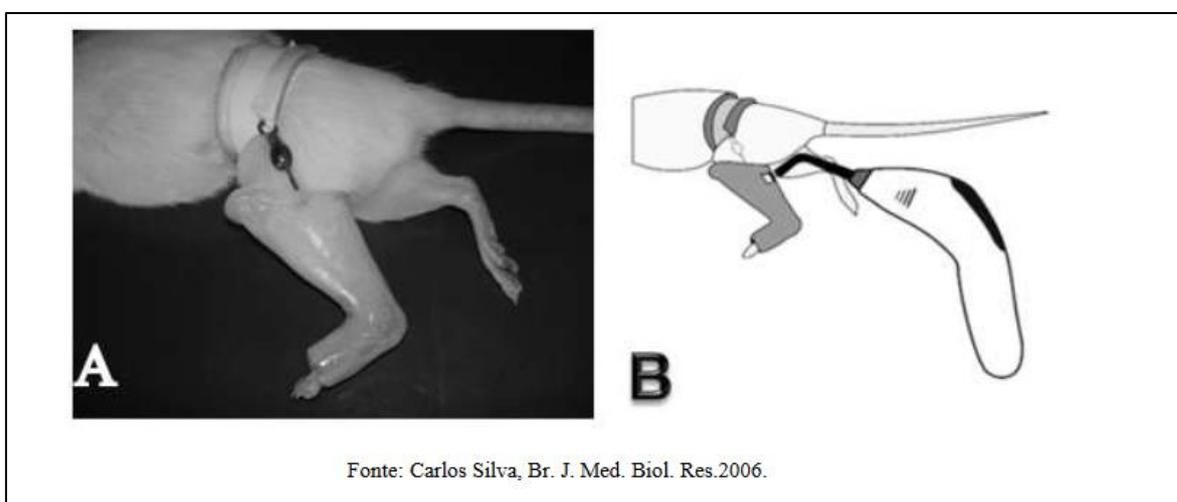
JUNIOR *et al.*, 2009;2011). Tendo em vista os eventos deflagrados pela imobilização e baseado na hipótese que a fototerapia com LED pode minimizar os efeitos deletérios causados pelo desuso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar se existem benefícios na aplicação da terapia com LED no músculo esquelético imobilizado tendo como parâmetro as concentrações plasmáticas de interleucina 6 e TNF α bem como a relação proteína/DNA e o conteúdo de glicogênio.

Materiais e Métodos

Animais: Foram utilizados ratos albinos Wistar adquiridos da empresa ANILAB -Paulínia, SP. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, submetidos a ciclo foto periódico claro/escuro de 12h e mantidos em gaiolas coletivas (4 animais) à temperatura ambiente controlada em torno de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram distribuídos em grupos experimentais, com $n=8$ e denominados de: Controle (C); tratado com fototerapia com LED(T); Imobilizados (I) e imobilizados tratados com fototerapia com LED (IT). Para a imobilização, o dispositivo de policloreto de vinil foi colocado no membro pélvico esquerdo mantendo a articulação do tornozelo na posição em 90° e deixando o quadril livre, cabe ressaltar que esta condição de desuso foi mantida por 7 dias (figura 1) (SILVA *et al.*, 2006). O aparelho de LED usado tem como características potência 300mW, comprimento de onda no vermelho 630nm e diâmetro de feixe $1,3\text{ cm}^2$. Programado o aparelho Bios Therapy II, aplicar na região muscular comprometida, procurar seguir as regiões anatômicas para realizar as aplicações, usar a ponteira do aparelho com uma ligeira pressão sobre a pele, repetir esta operação duas vezes por semana. Aplicar 3 pontos de 60 seg a cada 1 cm, com energia de $8\text{J}/\text{cm}^2$. Após o período experimental os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg, intraperitoneal) e amostras de sangue foram coletados da veia femoral e acondicionados em *ependorf*, estando os recipientes sob gelo, sendo prontamente centrifugado, também na condição de ambiente refrigerado e o plasma acondicionado em freezer -70° para posterior avaliação das concentrações das interleucinas no dia seguinte a coleta. Para determinação das citocinas séricas foi utilizado os seguintes Kits de aplicação laboratorial, a saber: TNF (Monoclonal Anti-TNF antibody produced in mouse REF.000001 MARCA WH0007124M2 Sigma-Aldrich clone 1C3-A1-F4,

purified immunoglobulin, buffered aqueous solution) e IL6 (I9646 Sigma-Aldrich REF.000001 MARCA Interleukin-6 from mouse). A seguir foram coletadas amostras do músculo gastrocnêmio para avaliação da concentração de glicogênio pelo método do fenol sulfúrico (SIU et al.,1970); proteínas e DNA através de Kit de aplicação laboratorial. A análise estatística foi realizada com a aplicação de ANOVA, seguido do teste de Tukey, $p < 0,05$. O estudo foi aprovado pela CEUA/UNIMEP sob protocolo01/2018.

Figura 1 -Órtese adaptada ao membro pélvico (A) e Posicionamento da aplicação da fototerapia com LED no músculo imobilizado (B)



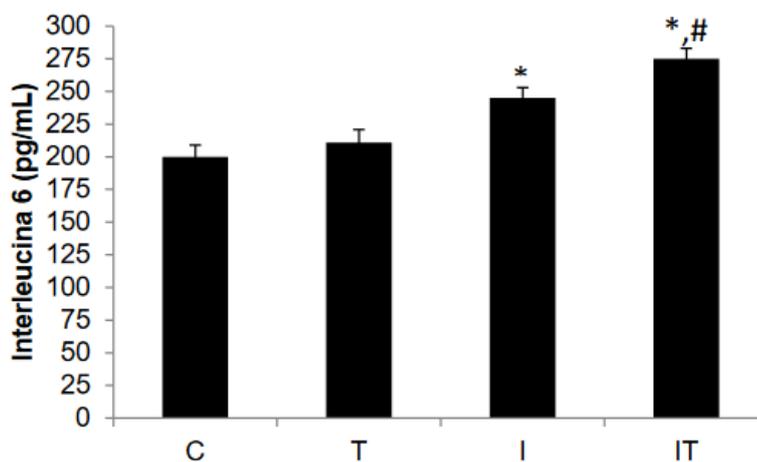
Resultados

A análise da concentração plasmática de interleucina 6(IL6), indicou que a fototerapia com LED quando aplicada em músculos normais (não imobilizados) não promove modificação neste parâmetro, por outro lado, foi observado que na condição de imobilização as concentrações de IL6 estavam 16% maiores em decorrência do desuso, condição que foi ainda maior atingindo valores 12% maiores no grupo tratado com LED. Um fato importante é que o músculo imobilizado tratado com LED, não apresentou concentrações plasmáticas diferentes do grupo controle (vide figura 2).

A seguir foi avaliado as concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) sendo observado que o tratamento com LED não modificou este parâmetro. Por sua vez, no grupo submetido à imobilização as concentrações plasmáticas de TNF- α apresentaram-se 30% maiores, condição que foi minimizada em 18% no grupo imobilizado tratado (figura 2). Enquanto

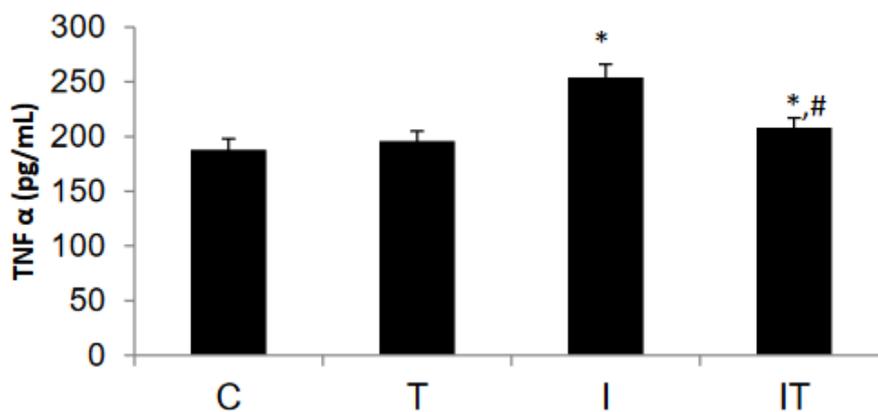
parâmetro metabólico foram analisadas as reservas glicogênicas (GLI) do músculo gastrocnêmio e não foi observado diferença se compararmos o grupo tratado com o controle. No que se refere as reservas GLI após imobilização foi constatado que o desuso promoveu o estabelecimento de reservas 40% menores, condição minimizada em 17% em decorrência do tratamento com LED (tabela 1). No que se refere a relação proteína/DNA foi observado redução de 32% devido ao desuso gerado pela imobilização, condição minimizada em 23% no grupo imobilizado tratado (tabela 1).

Figura 2 -Concentração plasmática de interleucina 6 (pg/ml) dos grupos controle (C), tratado com fototerapia com LED (T), imobilizado (I) e imobilizado tratado com fototerapia com LED (IT). Os valores correspondem à média \pm dp, n=6. *p<0,05 comparado ao controle; #p<0,05 comparado ao grupo imobilizado.



Fonte: Marco Bonvino (Arquivo pessoal)

Figura 3 -Concentração plasmática de TNF α (pg/ml) dos grupos controle (C), tratado com fototerapia com LED (T), imobilizado (I) e imobilizado tratado com fototerapia com LED (IT). Os valores correspondem à média \pm dp, n=6. *p<0,05 comparado ao controle; #p<0,05 comparado ao grupo imobilizado.



Fonte: Marco Bonvino (Arquivo pessoal)

Tabela 1-Concentração muscular de glicogênio (GLI; mg/100mg) e relação proteína/DNA (PT/DNA; mg/100mg) dos grupos controle (C), tratado com fototerapia com LED (T), imobilizados (I) e imobilizados tratados com fototerapia com LED (IT). Os valores correspondem a média \pm dp, n=6.

Grupos	C	T	I	IT
GLI	0,48 \pm 0,04	0,50 \pm 0,03	0,30 \pm 0,02*	0,36 \pm 0,03*,#
PT/DNA	22,4 \pm 0,1	23,2 \pm 0,3	15,2 \pm 0,3*	18,7 \pm 0,2*,#

*P<0,05 comparado ao controle e #p<0,05 comparado ao imobilizado.

Discussão

O músculo esquelético é um dos principais tecidos ligados ao controle glicêmico por apresentar mecanismos responsáveis pela captação, metabolização e expressivas reservas de glicose, contribuindo significativamente para a homeostasia metabólica (CURI e PROCÓPIO,2017). Neste contexto, pode-se destacar que as reservas musculares de glicogênio são uma importante fonte de energia durante a atividade contrátil, desta forma, mudanças no conteúdo, podem interferir no desempenho, ou seja, concomitante a elevação nas reservas observa-se melhora na resistência durante atividade física, porém, a redução das reservas tem relação direta com o desencadeamento de fadiga muscular (SESTI, 2006).

O presente estudo mostra que no músculo gastrocnêmio imobilizado houve redução significativa no conteúdo de glicogênio, condição que indica comprometimento na sinalização insulínica e conseqüente redução na atividade das vias glicogênicas citosólicas sugerindo que o desuso induziu o

desenvolvimento do quadro de resistência à insulina condição já descrita na literatura (PIERRE et al., 2016). Ainda dentro do perfil fisiológico foi verificado que no desuso muscular, além do comprometimento metabólico, também houve redução na massa, representado pela pequena relação proteína/DNA. Há de se considerar que a perda de massa provém de consequências funcionais adversas, assim, mesmo sendo consenso que o que deflagra a atrofia é a perda de tensão muscular, sabe-se que o comprometimento nas vias sinalizadoras promove um desequilíbrio nos processos responsáveis pela síntese de proteínas e ao mesmo tempo intensificam a proteólise, condição que também é relevante no desuso muscular (JACKMAN e KANDARIAN, 2004). Ainda no que tange ao desuso, tem sido descrito diminuição na área de secção transversa das fibras musculares, redução na produção de força, diminuição da densidade capilar, aumento da fadigabilidade e diminuição da sensibilidade à insulina, ação mais expressiva em fibras glicolíticas, tipagem de fibras predominante no músculo gastrocnêmio aqui estudado (FITTS et al., 2000). Assim, este estudo reitera a eficiência da órtese em gerar o desuso promovendo os desajustes classicamente descritos e foco de análise no estudo. Foi observado que a fototerapia com LED não promoveu modificações nas reservas energéticas nem na relação proteína/DNA, quando aplicada em músculos normais, este dado é importante por referendar que a fototerapia não gera desequilíbrio na homeostasia tecidual, assim qualquer que seja sua indicação, de forma que busque promover recuperação morfohistofisiológica em muitos tecidos, é sugestivo que esta terapia não agride os demais tecidos. Estudos com LEDterapia tem revelado muitas ações até então não relatadas na literatura. Neste estudo foi verificado que a terapia minimizou o comprometimento nas reservas glicogênicas e também preservou a perda de massa no grupo imobilizado tratado, representado pelas maiores reservas glicogênicas e melhor relação proteína/DNA. Um recente estudo constatou que a terapia com LED melhorou expressivamente a glicemia de diabéticos submetidos a exercício moderado, fato que pode indicar que a terapia atua ativando as vias citosólicas responsáveis pela captação de hexose pelos músculos, condição ímpar e relacionada diretamente com o sinal insulínico, atribuindo a LEDterapia a importante função de coadjuvante aos efeitos fisiológicos que modulam a homeostasia tecidual, indicando ainda que a fototerapia com LED pode interferir nas demais vias sinalizadoras citosólicas,

como por exemplo nas vias de síntese proteica, baseado na melhor relação proteína/DNA (FRANCISCO *et al.*, 2019). No que se refere às maiores concentrações plasmáticas de IL-6 no grupo submetido à imobilização, sabe-se que a tríade redução na sensibilidade insulínica, intensificação do catabolismo e limitação na capacidade contrátil contribuem para a ocorrência das menores reservas energéticas e nesta condição tem sido observado aumento na transcrição do gene de IL-6, e secreção de IL6 pelo tecido muscular esquelético, condição em que esta citocina estimula a glicogenólise hepática e a lipólise, provendo o sistema muscular de maior concentração de substratos metabolizáveis (PEDERSEN *et al.*, 2003; MOOREN e VOLKER, 2012; (DELOROSO *et al.* 2018). Sabe-se ainda que a elevação na concentração plasmática de IL-6 tem relação com o maior estresse mecânico ou lesão muscular, condições associadas que podem ter ocorrido/imposto pela órtese propiciando as alterações aqui descritas (PRESTES *et al.*, 2006; RUDERMAN *et al.*, 2006). TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, estando descrito na literatura que esta citocina promove redução na sinalização insulínica reduzindo a eficiência dos substratos do receptor de insulina no citosol, comprometendo a captação de glicose em tecidos insulínica se promovendo a resistência à insulina (KROGH-MADSEN *et al.*, 2006; ARSLAN *et al.*, 2010). Neste contexto sabe-se que a resistência à insulina no músculo esquelético tem expressão multifatorial através da diminuição na população do transportador de glicose (GLUT-4) e redução na fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) (ARSLAN *et al.*, 2010; SPERETTA *et al.*, 2014). Os dados aqui apresentados mostram que em decorrência da fototerapia com LED houve aumento na produção da interleucina 6 e conseqüente redução na concentração plasmática de TNF α , condição descrita na literatura onde está demonstrando que no tecido muscular, a produção de IL6 inibe a produção de TNF α (MOOREN e VOLKER, 2012). Esta capacidade da IL6 em promover redução na concentração plasmática de TNF α corrobora com um estudo que constatou que a LEDterapia pode atuar como um anabólico natural para o aumento da função muscular devido ao aumento na responsividade à insulina, maior atividade mitocondrial e volume muscular e pode indicar que a interleucina possa ter ativado a sinalização insulínica deprimida pelo desuso (MALDONADO *et al.*, 2004). Por fim, é sugestivo que a melhora nos padrões glicogênicos e na relação proteína/DNA,

observado no grupo imobilizado tratado com LEDterapia, se deve a capacidade da IL6 em minimizar os efeitos deletérios do TNF α e restabelecer funções celulares comprometidas pelo desuso. Assim, conclui-se que a LEDterapia ao promover melhora nas condições metabólicas torna-se um importante coadjuvante nos tratamentos do desuso muscular, cujo intuito é restabelecer a homeostasia metabólica e funcional.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

Referências

AYDIN,A. Hormones and cy-tokines in childhood obesity. Indian Pediatr. v.47,n.10,p.829-839, 2010.

BROOKS,N.E.;MYBURGH,K.H. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. Front. Physiol.v. 5, n.99, p.1-14,2014.

CARVALHO,M.M.;MARTINS,W.R.;BLACKZICK,J.C.;CRUZ JÚNIOR, C.A.;SOUZA,H.A;Kückelhaus,S.A.S. Análise morfológica dos efeitos da imobilização sobre o músculo gastrocnêmio de ratos. Univ.Ciências da Saúde. v.11, n.2,p.99–106, 2013.

COUTINHO,E.L.;GOMES, A.R.S.;FRANÇA, C.N, SALVINI, T.F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. Braz J Med Biol Res. v.35,n.11,p.1329-1332, 2002.

CURI, R;Araújo FilhoA.; PROCÓPIO,J. Fisiologia Básica, 2ª edição, de - Guanabara Koogan, 2017.

DASILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; POLACOW, M.L.O.; DURIGAN, J.L.Q. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses.Braz J Med Biol Res.v.39, n.7, p.979-985,2006.

FRANCISCO,C.O.;BELTRAME,T.;HUGHSON,R.L.;MILAN MATTOS,J.C.;FERROLIFABRÍCIO,A.M;GALVÃO BENZE,B.;FERRARESI,C.;P ARIZOTTO,N.A.;BAGNATO,V.S.;BORGHISILVA,A.;PORTA,A.;CATAI, A.M.

Effects of light-emitting diode therapy (LEDT) on cardiopulmonary and hemodynamic adjustments during aerobic exercise and glucose levels in patients with diabetes mellitus: A randomized, crossover, double-blind and placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med.* v.42, p.178-183, 2019.

GORGEY, A.S.; WITT, O.; O'BRIEN, L.; CARDOZO, C.; CHEN, Q.; LESNEFSKY, E.J.; GRAHAM, Z.A. Mitochondrial health and muscle plasticity after spinal cord injury. *Eur J Appl Physiol.* v.119, n.2, p.315-331, 2019.

GUO, T.Z.; WEI, T.; LI, W.W.; LI, X.Q.; CLARK, J.D.; KINGERY, W.S. Immobilization contributes to exaggerated neuropeptide signaling, inflammatory changes, and nociceptive sensitization after fracture in rats. *J Pain.* v.15, p.1033-45, 2014.

HEMMINGS, T.J.; KENDALL, K.L.; DOBSON, J.L. Identifying Dosage Effect of Light-Emitting Diode Therapy on Muscular Fatigue in Quadriceps. *J Strength Cond Res.* v.31, n.2, p.395-402, 2017.

HYATT, H.; DEMINICE, R.; YOSHIHARA, T.; POWERS, S.K. Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: A review of the causes and effects. *Arch Biochem Biophys.* v.15, p.49-60, 2019.

KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* v.287, n.4, p. 834-43, 2004.

JUNIOR, M.P.; ANDRADE, R.D.; LAZARINI, J.R.; ORNELLAS, F.H. Efeito agudo do exercício resistido sobre a interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa: uma revisão sistemática. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício,* v.9, n.56, p 597-604, 2015.

KROGHMADSEN, R.; PLOMGAARD, P.; MØLLER, K.; MITTENDORFER, B.; PEDERSEN, B.K. Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v.291, n.1, p.108-14, 2006.

KROGH-MADSEN, R.; PLOMGAARD, P.; KELLER, P.; KELLER, C.; PEDERSEN, B.K. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor- α gene expression in human subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v.286, p.E234-E238, 2004.

LEAL JUNIOR, E.C.; DE GODOI, V.; MANCALOSSO, J.L.; ROSSI, R.P.; DE MARCHI, T.; PARENTE, M.; GROSSELLI, D.; GENEROSI, R.A.; BASSO, M.; FRIGO, L.; TOMAZONI, S.S.; BJORDAL, J.M.; LOPES-MARTINS, R.A. Comparison between cold water immersion therapy (CWIT) and light emitting diode therapy (LEDT) in short-term skeletal muscle recovery after high

intensity exercise in athletes –preliminary results. *Lasers Med Sci.* v.26, n.4, p.493–501, 2011.

LEAL JUNIOR, E.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; ROSSI, R.P.; DE MARCHI, T.; BARONI, B.M.; DE GODOI, V, MARCOS, R.L.; RAMOS, L.; BJORDAL, J.M. Effect of cluster multi-diodelight emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers Surg Med.* v.41, n.8, p.572-7, 2009.

LO, S.; RUSSELL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 28, n. 2, p. 234-236, 1970.

MALDONADO, T.; PAOLILLO, F.R. C.; FERRARESI, C.; PARIZOTTO, N.A.; BAGNATO, V.S. Aumento da potência muscular de atletas jogadores de futebol com ledterapia (850 nm). XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2014.

MALLINSON, J.E.; MURTON, A.J. Mechanisms responsible for disuse muscle atrophy: Potential role of protein provision and exercise as countermeasures. *Nutrition.* v.29, n.1, p.22–28, 2013.

MARZUCA-NASSR, G.N.; VITZEL, K.F.; MURATA, G.M.; MÁRQUEZ, J.L.; CURI, R. Experimental Model of Hind Limb Suspension-Induced Skeletal Muscle Atrophy in Rodents. In: Guest P. (2019), (eds) Pre-Clinical Models. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, NY.

MENDES, B.V.; DELOROSO, F.T.; DELOROSO, M.G.B. A Biofotometria na Fisioterapia. *Sodebras.* v.13, n.146, 2018. MOOREN, C E VOLKER, F. *Fisiologia do exercício molecular e celular.* Santos Editora, 2012.

PEDERSEN, M.; BRUUNSGAARD, H.; WEIS, N.; HENDEL, H.W.; ANDREASSEN, B.U.; ELDRUP, E.; DELA, F, PEDERSEN, B.K. Circulating levels of TNF- α and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with Type-2 diabetes. *Mech Ageing Dev.* v.124, p.495-502, 2003a.

PEDERSEN, B.K.; STEENSBERG, A.; FISCHER, C.; KELLER, C.; KELLER, P.; PLOMGAARD, P.; FEBBRAIO, M.; SALTIN, B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil.* v.24, n.2-3, p.113-9, 2003b.

PANVELOSKI-COSTA, A.C.; PINTO JÚNIOR, D.A.C.; BRANDÃO, B.B.; MOREIRA, R.J.; MACHADO, U.F.; SERAPHIM, P.M. Resistive training reduces inflammation in skeletal muscle and improves the peripheral insulin sensitivity in obese rats induced by hyperlipidic diet. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v.55, n.2, p.155-163, 2011.

PIERRE, N.; APPRIOU, Z.; GRATAS-DELAMARCHE, A.; DERBRE, F. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier, 2016 Volume 14–n. 163–Julho/2019 ISSN 1809-3957.

PRESTES, J.; DONATTO, F.F.; DIAS, R.; FROLLIN, A.B.; CAVAGLIERI, C.R. Papel da Interleucina 6 como um sinalizador em diferentes tecidos durante o exercício físico. *Fitness&performancejournal.v.6,p.348-353,2006*.

POWERS, S.K.; LYNCH, G.S.; MURPHY, K.T.; REID, M.B.; ZIJDEWIND, I. Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue. *Med Sci Sports Exerc*. v.48, n.11, p.2307–2319, 2016.

RUDERMAN, N.B.; KELLER, C.; RICHARD, A.M.; SAHA, A.K.; LUO, Z.; XIANG, X.; GIRALT, M.; RITOV, V.B.; MENSHIKOVA, E.V.; KELLEY, D.E.; HIDALGO, J.; PEDERSEN, B.K.; KELLY, M. Interleukin-6regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes.v.55, Suppl 2:S48-54, 2006*.

SERAFIM, K.G. Effects of 940-nm light-emitting diode (LED) on sciatic nerve regeneration in rats. *Lasers Med Sci.v.27, n.1, p.113-119, 2012*.SESTIG. Pathophysiology of insulin resistance.*Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.v.20, n.4, p.665-79, 2006*.

SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; POLACOW, M.LO. DURIGAN, J.L.Q. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Br. J. Med. Biol. Res. v.39, p.979-85, 2006*.

SIU, LO. RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol. v.28, n.2, p.234-236, 1970*.

SPERETTA, G.F.F.; LEITE, R.D.; DUARTE, A.C.G. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10 Obesity, inflammation and exercise: focus on TNF-alpha and IL-10. *RevistaHUPE, v.13, n.1, p.61-69, 2014*.WHELTA, H.T. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J. Clin Laser Med Surg.v.19, p.305-314,2001*.

TERCEIRA PARTE

CONSIDERAÇÕES FINAIS
LIMITAÇÕES DO ESTUDO
PERPECTIVAS FUTURAS
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O foco da tese foi avaliar diferentes aspectos bioquímicos/metabólicos e o comportamento das miocinas em modelos experimentais onde foi aplicado a fotobiomodulação (FBM). Com base nos estudos apresentados, podemos concluir:

- A LEDterapia, quando aplicada em ilhotas pancreáticas isoladas (*in vitro*), promoveu aumento na secreção de insulina em concentrações crescentes de glicose, sugerindo ser uma terapia potencializadora do processo secretório;
- O tratamento de músculos imobilizados com LED foi efetivo em minimizar a redução nas reservas glicogênicas, bem como propiciou a manutenção da relação proteína/DNA, fatores primordiais para a melhora na resposta frente as exigências oferecidas quando submetido a tensão e estes dados demonstram a importância e a versatilidade da aplicação do LED;
- É sugestivo que a melhora nos padrões glicogênicos e na relação proteína/DNA, observado no grupo imobilizado tratado com LEDterapia, se deve a capacidade da IL6 em minimizar os efeitos deletérios do TNFalfa e restabelecer funções celulares comprometidas pelo desuso. A FBM por LED, ao promover melhora nas condições metabólicas, torna-se um importante coadjuvante nos tratamentos do desuso muscular, cujo intuito é restabelecer a homeostasia metabólica e funcional.

4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

No estudo I, novos estudos se fazem necessário para dirimir aspectos inerentes a densidade de potência luminosa do LED em estudos realizados em meio de incubação, ou seja, na placa de irradiação com 1 cm de profundidade, condição não avaliada neste estudo.

Nos estudos II e III referentes aos efeitos deletérios da imobilização, seria interessante fazer uma análise histológica dos músculos, além de analisar outros marcadores séricos, como a IL-10.

5 APLICAÇÃO CLÍNICA

O uso do LED como recurso terapêutico torna-se viável na prática clínica pelo baixo custo e pelo menor tempo de aplicação quando comparado ao *Laser*.

Mediante os resultados apurados é viável partir para pesquisas clínicas que envolvam processos de lesão ou desuso muscular, visando diminuir o processo inflamatório, melhorar as reservas de glicogênio, aumentar a circulação local, diminuindo, assim, o tempo de recuperação.

Além disso, pensando na possibilidade de um indivíduo passar por um período de imobilização (de regiões específicas do corpo ou no leito) espera-se que essa tese auxilie nas diversas hipóteses que tentam justificar por que o trabalho postural é importante, visto que os músculos posturais são os mais susceptíveis aos efeitos deletérios da imobilização.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C.M.; EBERT, S.M.; DYLE, M.C. Role of ATF4 in skeletal muscle atrophy. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v.20, n.3, p.164-168, 2017.
- AHTIKOSKI, A.M.; KOSKINEN, S.O.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; RISTELI, J.; TAKALA, T.E. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**, v.177, p.473-81, 2003.
- ANDERSEN, J.L.; GRUSCHY-KNUDSEN, T.; SANDRI, C.; LARSSON, L.; SCHIAFFINO, S. Bed rest increases the amount of mismatched fibres in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.86, p.455-460, 1999.
- APPELL, H.J. Muscular atrophy following immobilization. **Sports Med**, v.7, p.42-58, 1990.
- ATHERTON, P.J.; GREENHAFF, P.L.; PHILLIPS, S.M.; BODINE, S.C.; ADAMS, C.M.; LANG, C.H. Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.11, n.3, p.594-604, 2016.
- BARNETT, A. Using recovery modalities between training sessions in elite athletes: does it help? **Sports Med**; v.36, p.781-96, 2006.
- BARREIRO, E. Models of disuse muscle atrophy: therapeutic implications in critically ill patients. **Ann Transl Med**. v.6, p.29, 2018.
- BETTIS, T.; KIM, B.J.; HAMRICK, M.W. Impact of muscle atrophy on bone metabolism and bone strength: implications for muscle-bone crosstalk with aging and disuse. **Osteoporos Int**. v. 29, n.8, p. 1713-1720, 2018.
- BOOTH, F.W. Physiologic and biochemical effects of immobilization on muscle. **Clin Orthop**, v.219, p.15-20, 1987.
- BORSA, P.A.; LARKIN, K.A.; TRUE, J.M. Does phototherapy enhance skeletal muscle contractile function and postexercise recovery? A systematic review. **Journal of athletic training**. v. 48, p. 57-67, 2013.
- BOUZAKRI, K.; PLOMGAARD, P.; BERNEY, T.; DONATH, M.Y.; PEDERSEN, B.K.; HALBAN, P.A. Bimodal effect on pancreatic beta-cells of secretory products from normal or insulin-resistant human skeletal muscle. **Diabetes** v. 60, p. 1111–1121, 2011.
- CICILIOT, S.; ROSSI, A.C.; DYAR, K.A.; BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S. Int Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. **J Biochem Cell Biol**.;v. 45, p. 2191-2199, 2013.

COVINGTON, J.D.; TAM, C.S.; BAJPEYI, S.; GALGANI, J.E.; NOLAND, R.C.; SMITH, S.R.; REDMAN, L.M.; RAVUSSIN, E. Myokine Expression in Muscle and Myotubes in Response to Exercise Stimulation. **Med Sci Sports Exerc.**; v. 48, p. 384-390, 2016.

DAVINI, R.; NUNES, C.V. Alterações no sistema neuromuscular decorrentes do envelhecimento e o papel do exercício físico na manutenção da força muscular em indivíduos idosos. **Rev Bras Fisioter.** v.7, p.201-207, 2003.

DE ALMEIDA, P.; TOMAZONI, S.S.; FRIGO, L. 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**, v.29, p.653–658, 2014.

DESHMUKH, A.S. Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle. **Horm Mol Biol Clin Investig.** v.6, p.13-24, 2016.

DOHM, G.L. Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. **J Appl Physiol.** v.93, p.782-787, 2002.

FENGNA, L.; YINGHUI, L.; YEHUI, D.; CHIEN-AN, A.; YULONG T.A.; YULONG Y. Myokines and adipokines: Involvement in the crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 33, p.73-82, 2017.

FERRARESI, C.; HAMBLIN, M.R.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: performance, fatigue and repair benefited by the power of light. **Photonics & Lasers in Medicine**, v.1, p.267-286, 2017.

FOSCHINI, R.M.S.A.; RAMALHO, F.S.; BICAS, H.E.A. Células satélites musculares. **Arq Bras Oftalmol.** v.67, p.681-687, 2004.

FRONTERA, W.F.; OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. **Calcif Tissue Int.** v.96, n.3, p.183-195, 2014.

FUJIMOTO, T.; SUGIMOTO, K.; TAKAHASHI, T.; YASUNOBE, Y.; XIE, K.; TANAKA, M.; OHNISHI, Y.; YOSHIDA, S.; KURINAMI, H.; AKASAKA, H.; TAKAMI, Y.; TAKEYA, Y.; YAMAMOTO, K. Overexpression of Interleukin-15 exhibits improved glucose tolerance and promotes GLUT4 translocation via AMP-Activated protein kinase pathway in skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun.** v.509, p.994-1000, 2019.

HAMBLIN, M.R. Mechanisms and Mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochemistry and Photobiology**, v.94, p.199–212, 2018.

HE, Z.; TIAN, Y.; VALENZUELA, P.L.; HUANG, C.; ZHAO, J.; HONG, P.; HE, Z.; YIN, S.; LUCIA, A. Myokine Response to High-Intensity Interval vs. Resistance Exercise: An Individual Approach. **Front Physiol.** v.9, p.1735- 1739, 2018.

HEISKANEN, V.; MICHAEL, R.; HAMBLIN, M.R. Photobiomodulation: Lasers vs Light Emitting Diodes? **Photochem Photobiol Sci.** v.17, p.1003–1017.,2018.

HERBISON, G.J.; JAWEED, M.M.; DITUNNO, J.F. Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. **Arch Phys Med Rehabil**, v.59, p.301-305, 1978.

HESLINGA, H.J.; KRONNIE, G.; HUIJING, P.A. Growth and immobilization effects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rat. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v.70, p.49-57, 1995.

HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.; YASUHARA, S.; MARTYN, J.A. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.279, n.1235-1241, 2000.

HODY, S.; CROISIER, J.L.; BURY, T.; REGISTER, B.; LEPRINCE, P. Eccentric Muscle Contractions: Risks and Benefits. **Front Physiol**.v.10, p.536 – 542, 2019.

HUANG, Y.Y.; CHEN, A.C.; CARROLL, J.D.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. Dose-response: a publication of **International Hormesis Society**, v.7, p.358-83, 2009.

HYATT, H.; DEMINICE, R.; YOSHIHARA, T.; POWERS, S.K. Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: A review of the causes and effects. **Arch Biochem Biophys**. v.662, p.49-60, 2019.

JIN, Z; BIN, L; CHUN, L; YANGXIN, L; YAO-HUA, S. Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting. **Trends Endocrinol Metab**, v.27, p.335-347, 2016.

JÓZSA, L.; THORING, J.; JARVINEN, M.; KANNUS, P.; LEHTO, M.; KVIST, M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: An experimental study in the rat calf muscles. **Exp Mol Pathol**, v.49, p.267-278, 1988.

KANG, C.; JI, L.L. Muscle immobilization and remobilization downregulates PGC-1 α signaling and the mitochondrial biogenesis pathway. **J Appl Physiol** . v.115, n.11, 1618-25, 2013.

KIM, J.W.; KWON, O.Y.; KIM, M.H. Differentially expressed genes and morphological changes during lengthened immobilization in rat soleus muscle. **Differentiation**. v.75, p.147-157, 2007.

KODAMA, F.Y.; CAMARGO, R.C.T.; JOB, A.E.; OZAKI, G.A.T.; KOIKE, T.E.; CAMARGO-FILHO, J.C.S. Propriedades mecânicas do músculo de ratos adultos e idosos, exercitado pós-imobilização. **Acta ortop bras**. v.20, p.218-222, 2012.

LAWLER, J.M.; SONG, W.; DEMAREE, S.R. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. **Free Radic Biol Med**, v.35, p.9-16, 2003.

LEAL-JUNIOR, E.C.; VANIN, A.A.; MIRANDA, E.F.; DE CARVALHO, P.D.E.T.; DAL CORSO, S.; BJORDAL, J.M. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. **Lasers Med Sci**, v.30, n.2, p.925-939, 2015.

LEERMAKERS, P.A.; KNEPPERS, A.E.M.; SCHOLS, A.M.W.J.; KELDERS, M.C.J.M.; DE THEIJE, C.C.; VERDIJK, L.B.; VAN LOON, L.J.C.; LANGEN, R.C.J.; GOSKER, H.R.M. Skeletal muscle unloading results in increased mitophagy and decreased mitochondrial biogenesis regulation. **Muscle Nerve**. v.60, p.769-778, 2019.

LEÓN, H.H.; MELO, C.E.; RAMÍREZ, J.F. Role of the myokines production through the exercise. **Journal of Sport and Health Research**. v.4, p.157-166, 2012.

LIEBER, R.L.; FRIDEN, J.O.; HARGENS, A.R.; DANZIG, L.A.; GERSHUNI, D.H. Differential response of the dog quadriceps muscle to external skeletal fixation of the kneel. **Muscle Nerve**, v.11, p. 193-201, 1988.

LIEBER, R.L.; ROBERTS, T.J.; BLEMKER, S.S.; LEE, S.S.M.; HERZOG, W.J. Skeletal muscle mechanics, energetics and plasticity. **Neuroeng Rehabil**. v.14, p.108, 2017. doi: 10.1186/s12984-017-0318-y.

LIEBER, R.L. Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation. 2.ed. **Philadelphia: LIPPINCOTT**, 2002.

LIGHTFOOT, A.P.; COOPER, R.G. The role of myokines in muscle health and disease. **Curr Opin Rheumatol**. v.28, p.661-66, 2016.

MACDOUGALL, J.D.; ELDER, G.C.; SALE, D.G.; MOROZ, J.R.; SUTTON, J.R. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. **Eur J Appl Physiol**, v.43, p.25-34, 1980.

MARQUES, A.P.; PECCIN, M.S. Pesquisa em fisioterapia: a prática baseada em evidências e modelos de estudos. **Fisioterapia e Pesquisa**. v.11, n.5, p.43-48, 2015.

MERCIER, C.; JOBIN, J.; LEPINE, C.; SIMARD, C. Effects of hindlimb suspension on contractile properties of young and old rat muscles and the impact of electrical stimulation on the recovery process. **Mech Ageing Dev**, v.106, p.305-320, 1999.

MIRANDA, E.F.; LEAL-JUNIOR, E.C.; MARCHETTI, P.H.; DAL CORSO, S. Acute effects of light emitting diodes therapy (LEDT) in muscle function during isometric exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease: preliminary results of a randomized controlled trial. **Lasers Med Sci**, v.29, p.359-365, 2014.

MOON, Y.S.; KWON, D.R. LEE, Y.J. Therapeutic effect of microcurrent on calf muscle atrophy in immobilized rabbit. **Muscle Nerve**. v.58, p.270-276, 2018.

MOOREN, F.; VOLKER, K. **Fisiologia do Exercício Molecular e Celular**, Santos editora l. 2012.

MUÑOZ-CÁNOVES, P.; CHEELE, C.; PEDERSEN, B.K.; SERRANO, A.L. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? **FEBS J**. v.280, p.4131-4148, 2013.

MUSACCHIA, X.J.; STEFEN, J.M.; FELL, R.D. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. **Exerc Sport Sci Rev**, v.16, p.61-87, 1988.

NAMPO, F.K.; CAVALHERI, V.; DOS SANTOS SOARES, F.; DE PAULA RAMOS, S.; CAMARGO, E.A. Low-level phototherapy to improve exercise capacity and muscle performance: a systematic review and meta-analysis. **Lasers Med Sci.** v.31, p.1957-1970, 2016.

NASCIMENTO, C.C.F.; PADULA, N.; MILANI, J.G.; SHIMANO, A.C.; MARTINEZ, E.Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A.C. Histomorphometric analysis of the response of rat skeletal muscle to swimming, immobilization and rehabilitation **Braz J Med Biol Res.** v.41, p.818-824, 2008.

NADEAU, L.; AGUER, C. Interleukin-15 as a myokine: mechanistic insight into its effect on skeletal muscle metabolism. **Appl Physiol Nutr Metab.** v.44, p.229-238, 2019.

ONDA, A.; KONO, H.; JIAO, Q.; AKIMOTO, T.; MIYAMOTO, T.; SAWADA, Y.; SUZUKI, K.; KUSAKARI, Y.; MINAMISAWA, S.; FUKUBAYASHI, T. New mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization. **Muscle Nerve.** v.54, p.788-791, 2016.

PAOLILLO, F.R.; MILAN, J.C.; ANICETO, I.V.; BARRETO, S.G.; REBELATTO, JR; BORGHI-SILVA, A., et al. Effects of infrared-LED illumination applied during high-intensity treadmill training in postmenopausal women. **Photomed Laser Surg,** v. 29, p.639-645, 2011.

PEAKE, J.M.; DELLA GATTA, P.; SUZUKI, K.; NIEMAN, D.C. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. **Exerc Immunol Rev.** v.21, p.8-25, 2015.

PEDERSEN, B, K; FEBBRAIO, M, A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. Nature Reviews. **Endocrinology,** v.3, p.8, 2012.

PICCIRILLO, R. Exercise-Induced Myokines With Therapeutic Potential for Muscle Wasting. **Front Physiol.** v.10, p.287, 2019.

PLOUG, T.; OHKUWA, T.; HANDBERG, A.; VISSING, J.; GALBO, H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v.268, p.980-986, 1995.

RATHBONE, C.R.; YAMANOUCHI, K.; CHEN, X.K.; NEVORET-BELL, C.J.; RHOADS, R.P.; ALLEN, R.E. Effects of transforming growth factor-beta (TGF-b1) on satellite cell activation and survival during oxidative stress. **J Muscle Res Cell Motil.** v.32, p.99–109, 2011.

REARDON, K.A.; DAVIS, J.; KAPSA, R.M.; CHOONG, P.; BYRNE, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. **Muscle Nerve,** v.24, p.893-9, 2001.

RICHTER, E. A; HARGREAVES, M. Exercise GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. **Physiol Rev.** v.93,n.3, p.993-1017, 2013.

SALVINI, T.F. Plasticidade e adaptação dos músculos esqueléticos. In: MARQUES, A.P. **Cadeias musculares. Um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global**. São Paulo: MANOLE, 2000.

SAMPAIO, R.F.; MANCINI, M.C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **83 Rev. bras. fisioter.**, São Carlos, v. 11, n. 1, p. 83-89, 2007.

SANCHIS-GOMAR, F.; LOPEZ-LOPEZ, S.; ROMERO-MORALES, C.; MAFFULLI, N.; LIPPI, G.; PAREJA-GALEANO, H. Neuromuscular Electrical Stimulation: A New Therapeutic Option for Chronic Diseases Based on Contraction-Induced Myokine Secretion. **Front Physiol.** v.28, p.1463, 2019.

SAVOLAINEN, J.; VAANANEN, K.; PURANEN, J.; TAKALA, T.E.; KOMULAINEN, J.; VIHKO, V. Collagen synthesis and proteolytic activities in rat skeletal muscle: effect of cast-immobilization in the lengthened and shortened positions. **Arch Phys Med Rehabil**, v.69, p.964-969, 1988.

SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; POLACOW, M.L.O.; DURIGAN, J.L.Q. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.39, p.979-85, 2006.

SIU, L.O.; RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.** 28: 234-236, 1970.

SUETTA, C.D. Plasticity and function of Human skeletal muscle in relation to disuse and rehabilitation: Influence of ageing and surgery. **Med J.** v.64, p.5377, 2017.

SUN, L.W.; BLOTTNER, D.; LUAN, H.Q.; SALANOVA, M.; WANG, C.; NIU, H.J.; FELSEBERG, D.; FAN, Y.B. Bone and muscle structure and quality preserved by active versus passive muscle exercise on a new stepper device in 21 days tail-suspended rats. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** v.2, p.166-177, 2013.

TANAKA, T.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. **J Orthop Sci**, v.9, p.76-85, 2004.

TATMATSU-ROCHA, J.C.; DE CASTRO, C.A.; SENE-FIORESE, M.; PARIZOTTO, N.A. Light-emitting diode modulates carbohydrate metabolism by pancreatic duct regeneration. **Lasers in Medical Science**; 2017; 1-9. DOI: 10.1007/s10103-017-2245-3.

THOMSON, D.M. The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. **Int J Mol Sci.** v.19, p.3125, 2018.

TIDBALL, J.G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Compr Physiol.** v.1, p.2029-2062, 2011.

VASCONCELOS, A.B.; NAMPO, F.K.; MOLINA, J.C.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, A.S.; ANGELIS, T.R.; HASUDA, A.L.; CAMARGO, E.A.; RAMOS, S.P. Modulation of exercise-induced muscular damage and hyperalgesia by different 630 nm doses of light-emitting diode therapy (LEDT) in rats. **Lasers Med Sci.** v.34, p.749-758, 2019.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Mosc)** v.69, p.81-90, 2004.

WAHL, P.; HEIN, M.; ACHTZEHN, S.; BLOCH, W.; MESTER, J. Acute effects of superimposed electromyostimulation during cycling on myokines and markers of muscle damage. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** v.15, p.53-59, 2015.

WALL, B.T.; DIRKS, M.L.; VAN LOON, L. Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia. **J Ageing Res Rev.** v.12, p.898-906, 2013.

WANG, Y.; PESSIN, J.E.C. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v.16, p.243-250, 2013.

WASHINGTON, T.A.; WHITE, J.P.; DAVIS, J.M.; WILSON, L.B.; LOWE, L.L.; SATO, S. Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice. **JA. Acta Physiol (Oxf)**, v.202, p.657-69, 2011.

WHITE, M.F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Mol Cell Biochem** v.182, p.3-11, 1998.

WILLIAMS, P.E.; GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. **J Anat**, v.127, p.459-68, 1978.

WILLIAMS, P.E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **J. Anat**, v.138, p.343-50, 1984.

WUNDERLICH, F.T.; STROHLE, P.; KONNER, A.C.; GRUBER, S.; TOVAR, S.; BRONNEKE, H.S.; JUNTTI-BERGGREN, L.; LI, L.S.; VAN ROOIJEN, N.; LIBERT, C. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. **Cell Metab**, v.12, p.237–249, 2010.

YAKABE, M.; OGAWA, S.; OTA, H.; IJIMA, K.; ETO, M.; OUCHI, Y.; AKISHITA, M. Inhibition of interleukin-6 decreases atrogene expression and ameliorates tail suspension-induced skeletal muscle atrophy. **PLoS One.** v.13, e0191318, 2018.

YANG, J. Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis. **Prog Mol Biol Transl Sci.** v.121, p.133-163, 2014.

ZHENG, L.F.; CHEN, P.J.; XIAO, W.H.; SHENG LI, X. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. **Bao.** v.71, p.671-679, 2019.

ZHOU, J.; LIU, B.; LIANG, C.; LI, Y.; SONG, Y.H. Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting. **Trends Endocrinol Metab.** v.27, p.335-347, 2016.