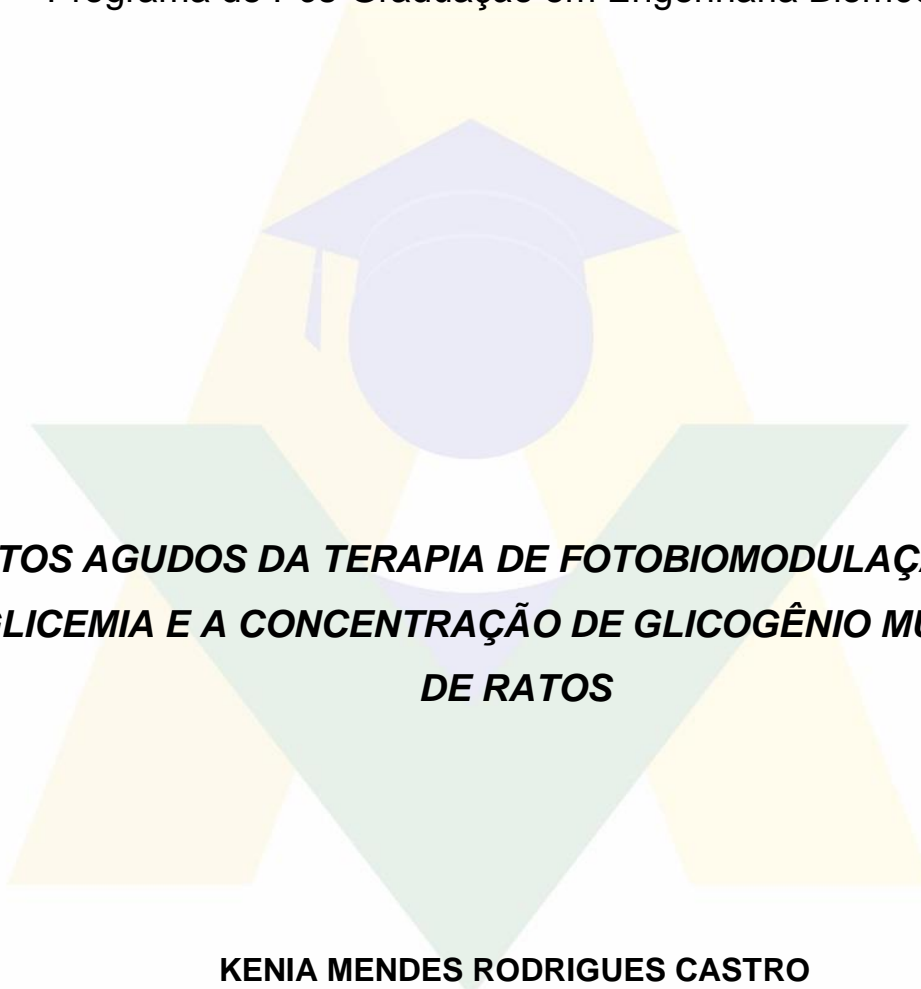


Universidade Brasil – Campus Itaquera
Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica



***EFEITOS AGUDOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE
A GLICEMIA E A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR
DE RATOS***

KENIA MENDES RODRIGUES CASTRO

Orientador: Prof. Dr. Cleber Ferraresi
Coorientador: Prof. Dr. Claudio Alberto Tellez Soto

São Paulo, SP
2020

**ACUTE EFFECTS OF PHOTOBIMODULATION THERAPY ON
GLYCEMIA AND MUSCULAR GLUCOGEN CONCENTRATION OF
RATS**

KENIA MENDES RODRIGUES CASTRO

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica da Universidade
Brasil, como parte dos requisitos
necessários para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Biomédica.**

Área de Concentração: Procedimentos
terapêuticos utilizando radiação não ionizante

Orientador: Prof. Dr. Cleber Ferraresi

Coorientador: Prof. Dr. Claudio Alberto Tellez Soto

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

C352e CASTRO, Kenia Mendes Rodrigues
Os efeitos agudos da fotobiomodulação sobre a glicemia e a concentração de glicogênio em ratos / Kenia Mendes Rodrigues Castro. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2020.
45 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Ferraresi.

Coorientador: Prof. Claudio Alberto Tellez Soto.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

1. Laserterapia. 2. LEDs. 3. Glicogênio. 4. Glicose. 5. Glicemia. I. Ferraresi, Cleber. II. Soto, Claudio Alberto Tellez. III. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO

KENIA MENDES RODRIGUES CASTRO

**"EFEITOS AGUDOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A GLICEMIA E A
CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR DE RATOS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Cleber Ferraresi

Prof.(a). Dr.(a) Cleber Ferraresi (presidente-orientador)

Livia Assis Garcia

Prof.(a). Dr.(a) Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

José Carlos Tatmatsu Rocha

Prof.(a). Dr(a) José Carlos Tatmatsu Rocha (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)

São Paulo, 26 de março de 2020
Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Cleber Ferraresi

Houve alteração do Título: sim () não (x):

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **"EFEITOS AGUDOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A GLICEMIA E A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR DE RATOS"**

Houve alteração do Título: sim () não (x)

Autor(es):

Discente: **Kenia Mendes Rodrigues Castro**

Assinatura: *Kenia Mendes Rodrigues Castro*

Orientador(a): **Prof. Dr. Cleber Ferraresi**

Assinatura: *Cleber Ferraresi*

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 26/03/2020

À minha família por ser meu alicerce!
Às minhas tias: Dete e Bebé (in memoriam).
Aos meus filhos: Marcelo e Samuel.
Ao meu esposo: Cláudio.
Aos amigos verdadeiros.
A todos professores que tive até hoje!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo um alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

RESUMO

A fotobiomodulação (FBM) tem muitos efeitos sobre o metabolismo energético do tecido musculoesquelético, como aumento de síntese de glicogênio. No entanto, esses efeitos podem ser de proporção sistêmica, como o controle glicêmico. O objetivo primário foi avaliar os efeitos da fotobiomodulação (FBM) por LEDs (*light-emitting diodes*) sobre os níveis glicêmicos e a concentração de glicogênio muscular de ratos não diabéticos. Os objetivos secundários foram avaliar os efeitos agudos de 4 doses de FBM (dose-resposta: sham, 10 J/cm², 30 J/cm², 60 J/cm²) sobre os níveis glicêmicos de ratos ao longo de 6 horas (tempo-resposta: pré irradiação, 1 hora, 3 horas, 6 horas) após irradiação; e avaliar os efeitos agudos de dose-resposta da FBM sobre os níveis de glicogênio muscular de ratos após 24 horas da irradiação. Por fim, correlacionar as modulações dos níveis glicêmicos e as concentrações de glicogênio muscular após aplicação de 4 diferentes doses de FBM. Vinte e quatro ratos Wistar foram alocados aleatoriamente e igualmente em quatro grupos: sham (terapia placebo), FBM 10J/cm², FBM 30J/cm² e FBM 60 J/cm². Os animais ficaram em jejum por 6 horas. A alimentação foi retirada imediatamente antes da FBM. As avaliações de glicemia foram realizadas nos momentos pré-irradiação (imediatamente antes da FBM), 1h, 3h e 6h. A síntese de glicogênio muscular foi mensurada 24h após a FBM. A FBM usou um arranjo de 69 LEDs (*light-emitting diodes*) com 35 vermelhos (630 ± 10 nm) e 34 infravermelhos (850 ± 20 nm); 114 mW/cm² por 90 s (10J/cm²), 270s (30J/cm²), 540s (60J/cm²) aplicados no dorso, glúteo e membros posteriores dos animais. O grupo 10J/cm² apresentou menor variabilidade glicêmica ao longo de 6 horas (5,92 mg/dL) comparado aos grupos sham (13,03 mg/dL), 30J/cm² (7,77 mg/dL) e FBM 60 J/cm² (9,07 mg/dL). Os grupos FBM tiveram o maior incremento de glicogênio muscular (10 J/cm² > 60 J/cm² > 30 J/cm² > sham), caracterizando uma dose-resposta trifásica da FBM. Houve forte correlação negativa entre a variabilidade glicêmica ao longo de 6h e a concentração de glicogênio muscular para 10J/cm² (r= -0,94; p<0, 001) seguida pela 30 J/cm² (r= -0,84; p<0,001) e 60J/cm² (r= -0,73; p<0,006). Os resultados sugerem que a FBM pode ter um papel muito importante no controle dos níveis glicêmicos, e o seu possível mecanismo de ação é a indução de maior síntese de glicogênio muscular independente da realização de exercício físico.

PALAVRAS-CHAVE: laserterapia, LEDs, glicogênio, glicemia, glicose.

ABSTRACT

Photobiomodulation (PBM) has many effects on the energetic metabolism of musculoskeletal tissue, such as increased glycogen synthesis. However, these effects can be systemic, such as glycemic control. The primary objective was to evaluate the effects of photobiomodulation (PBM) by LEDs (light-emitting diodes) on glycemic levels and muscle glycogen concentration in non-diabetic rats. The secondary objectives were to evaluate the acute effects of 4 doses of PBM (dose-response: sham, 10 J/cm², 30 J/cm², 60 J/cm²) on glycemic levels in rats over 6 hours (time-response: pre irradiation, 1 hour, 3 hours, 6 hours) after irradiation; and to evaluate the acute effects of dose-response of PBM on muscle glycogen levels in rats after 24 hours of irradiation. Finally, to correlate glycemic modulations with muscle glycogen concentrations after applying 4 different doses of PBM. Twenty-four Wistar rats were randomly and equally allocated to four groups: sham (placebo therapy), PBM 10J/cm², PBM 30J/cm², and PBM 60 J/cm². The animals fasted for 6 hours. Feeding was interrupted immediately before PBM. Evaluations of glucose level were performed at pre-irradiation times (immediately before PBM), 1h, 3h and 6h. Muscle glycogen synthesis was measured 24 hours after PBM. PBM used an arrangement of 69 LEDs (light-emitting diodes) with 35 reds (630 ± 10 nm) and 34 infrared (850 ± 20 nm); 114 mW/cm² for 90 s (10J/cm²), 270s (30J/cm²), 540s (60J/cm²) applied to the back, gluteus, and hind limbs of the animals. The 10J/cm² group showed lower glycemic variability over 6 hours (5.92 mg/dL) compared to the sham (13.03 mg/dL), 30J/cm² (7.77 mg/dL) and PBM 60 J/cm² (9.07 mg/dL) groups. The PBM groups had the highest increase in muscle glycogen (10 J/cm² > 60 J/cm² > 30 J/cm² > sham), characterizing a three-phase dose-response to PBM. There was a strong negative correlation between glycemic variability over 6h and muscle glycogen concentration for 10J/cm² (r= -0.94; p<0.001) followed by 30 J/cm² (r= -0.84; p<0.001) and 60J/cm² (r= -0.73; p<0.006). The results suggest that PBM can play a very important role in the control of glycemic levels, and its possible mechanism of action is the induction of greater muscle glycogen synthesis independent of physical exercise.

KEY WORDS: low-level laser therapy, LEDs, glycogen, glycemia, glucose.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A FBM por LED produz efeitos na glicemia (efeito sistêmico) e síntese de glicogênio de ratos, quando aplicada no dorso e membros posteriores de animais não diabéticos. Nesse experimento, a FBM proporcionou menor variabilidade dos níveis glicêmicos ao longo de 6 horas para todos os grupos irradiados por LED. Com destaque para a dose de 10 J/cm² comparado aos grupos sham (terapia placebo), 30 e 60 J/cm². Os grupos de 10 J/cm² e 60 J/cm² foram os grupos com o maior incremento de glicogênio muscular, comparado ao grupo irradiado com 30 J/cm². Por fim, houve uma correlação negativa, forte e significativa entre a variabilidade dos níveis glicêmicos (ao longo de 6h) e a concentração de glicogênio muscular, indicando que quanto menor a variação glicêmica, maior a síntese de glicogênio muscular. Esses efeitos são atribuídos a influência da luz no metabolismo mitocondrial, o qual desencadeia respostas bioquímicas secundárias à nível celular para a sinalização de vias que aumentam a captação de glicose para o interior da célula muscular e síntese de glicogênio. Acrescenta-se que a FBM produz efeitos nos tecidos com dose e tempo resposta dependente. Portanto, diferentes quantidades de energia (doses) condicionam um comportamento específico ao longo do tempo no tecido irradiado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Cadeia Transportadora de Elétrons.....	19
Figura 02: Via de ativação AKT e GLUT4.....	20
Figura 03: Desenho Experimental.....	25
Figura 04: FBM por LED.....	26
Figura 05: Efeito da fotobiomodulação por LEDs sobre os níveis glicêmicos de ratos não diabéticos.....	30
Figura 06: Efeito da fotobiomodulação por LEDs sobre a concentração muscular de glicogênio de ratos não diabéticos.....	31
Figura 07: Efeito da variabilidade dos níveis glicêmicos sobre a concentração muscular de glicogênio de ratos não diabéticos submetidos ao tratamento sham ou fotobiomodulação por LEDs com doses de 10, 30 e 60 J/cm ²	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros da fotobiomodulação por LEDs (light-emitting diode) de baixa intensidade.....	26
Tabela 2: variabilidade dos níveis glicêmicos dos animais ao longo de 6 horas....	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LEDs	Light-Emitting Diodes
FBM	Fotobiomodulação
ATP	Adenosina Trifosfato
Acetil-CoA	Acetil- coenzima A
nm	Nanômetro
mW	Miliwatt
W	Watt
J	Joule
AKT	Proteínas Quinase B
AS160	Substrato de AKT160
GLUT4	Transportadora de Glicose 4
JNK	Quinase c-Jun n - terminal
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutationa peroxidase
°C	Grau Celsius
CEUA	Comissão de ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimento de animal
cm ²	Centímetro quadrado
mg	Miligrama
kg	Quilograma
NaOH	Hidróxido de Sódio
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance
UDP-glicose	Difosfogluose de Uredina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DA LITERATURA	17
PROPOSIÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
Grupos experimentais	23
Fotobiomodulação por LED (<i>light-emitting diodes</i>) de baixa intensidade	24
Glicemia	26
Procedimentos de anestesia, cirurgia e sacrifício	26
Glicogênio muscular	27
Análise estatística	27
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	37
ANEXO - A	38
ANEXO - B	37
REFERÊNCIAS	40

INTRODUÇÃO

A fotobiomodulação por LEDs (*Light-Emitting Diodes*) tem sido utilizada para diversos fins terapêuticos, como prevenção e/ou redução do estresse oxidativo (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; FERRARESI *et al.*, 2015c), controle glicêmico em pacientes diabéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2019) e redução na inflamação e resistência à insulina em modelos experimentais (YOSHIMURA; SABINO; RIBEIRO, 2016; SILVA *et al.*, 2017) sendo, portanto, importante recurso terapêutico e tecnológico.

O principal mecanismo de ação da fotobiomodulação (FBM) sobre os tecidos biológicos é absorção dos fótons de luz, emitidos por *lasers* ou LEDs, por moléculas chamadas de cromóforos (HUANG *et al.*, 2009). Dentre os cromóforos identificados, a enzima citocromo c oxidase, localizada no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, é a principal molécula absorvedora dos fótons da FBM na faixa do vermelho e infravermelho próximo (KARU, 1999; CHUNG *et al.*, 2012).

A modulação do metabolismo mitocondrial por meio da fotobiomodulação é algo bem documentado na literatura (KARU, 1999; HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011; FERRARESI *et al.*, 2015b). Esta promove incrementos no potencial de membrana mitocondrial e na síntese de adenosina trifosfato (ATP) com resposta tempo-dependente após a irradiação do tecido muscular (*in vitro e in vivo*) (FERRARESI *et al.*, 2015a; FERRARESI *et al.*, 2015b) e dose-resposta, a qual se apresenta em dose resposta bifásica e, às vezes trifásica (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011).

No entanto, para que o metabolismo mitocondrial aumente após a FBM, é necessário também que ocorra aumento na atividade do ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico), fato já evidenciado, considerando que a FBM parece aumentar a atividade da enzima citrato sintase em tecido muscular, marcador da atividade deste ciclo (AQUINO *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2017). Nesse contexto, a glicemia desempenha papel relevante na resposta à FBM, pois fornecerá o substrato primário para a glicólise no citosol celular (geração de piruvato) para induzir a atividade do ciclo de Krebs. Assim, a FBM pode reduzir a glicose no compartimento plasmático sanguíneo, com incremento na formação de piruvato e acetil-coenzima A (acetil-CoA) na mitocôndria intermediado, talvez, pela maior atividade da cadeia transportadora de elétrons (VIEIRA *et al.*, 2017).

Os mecanismos de ação para a FBM promover efeitos sistêmicos e diminuir os níveis glicêmicos ainda não são bem compreendidos ou elucidados. Porém, sugere-se que o aumento no metabolismo energético e na função mitocondrial, principalmente do musculoesquelético (FERRARESI; HAMBLIN e PARIZOTTO, 2012; FERRARESI et al., 2015a; FERRARESI et al., 2015b), possam ter relação direta com a redução nos níveis glicêmicos por aumentar o consumo de glicose pelo tecido muscular para atividade contrátil e/ ou síntese de glicogênio muscular (FERRARESI et al., 2015c).

Nesse contexto, a maior síntese de glicogênio muscular mediada pela FBM já tem sido reportada por nosso grupo de pesquisa (FERRARESI et al., 2015c), o que pode ser decorrente da modulação da expressão de genes musculares (FERRARESI et al., 2016) que codificam proteínas (enzimas) específicas e chave nesse processo, como a glicogênio sintase e a fosfoglicomutase. Porém, ainda não foi demonstrada a relação entre os níveis glicêmicos e a síntese de glicogênio muscular mediados pela FBM para se comprovar esse efeito sistêmico.

Assim, considerando os efeitos da FBM sobre o metabolismo energético celular supracitados, sobretudo no tecido muscular, bem como a dose e o tempo-resposta característico, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da FBM por LEDs sobre os níveis glicêmicos (efeito sistêmico) e a concentração de glicogênio muscular (efeito local) de ratos.

REVISÃO DA LITERATURA

A fotobiomodulação (FBM) é uma terapia baseada na luz emitida por lasers (*light amplification by stimulated emission of radiation*) e/ou LEDs (*light-emitting diodes*) de baixa intensidade, sendo que estas fontes de luz podem ser aplicadas separadamente ou de forma combinada no mesmo equipamento para irradiação do tecido (ANTONIALLI et al., 2014). Esta terapia é realizada utilizando comprimento de onda específico (600-1.000 nm), potência entre 1 mW e 500 mW, e densidade de potência entre 1 mW/cm² e 5 W/cm² (LEAL et al., 2010). Estas condições viabilizam reações fotoquímicas, nas quais a luz é absorvida e induz uma mudança química nos tecidos, não apresentando efeito térmico (DE MARCHI et al., 2017).

Vale mencionar que uma dificuldade na utilização da luz de LED ou laser de baixa intensidade consiste na escolha da quantidade de energia a ser administrada para desenvolver efeitos positivos no tecido (TUNÉR e JENKINS, 2016). Para tanto, um comprimento de onda apropriado, isto é, uma "janela óptica" específica, permite a penetração efetiva da luz e, por conseguinte, uma resposta bifásica é maximizada (HUANG et al., 2011).

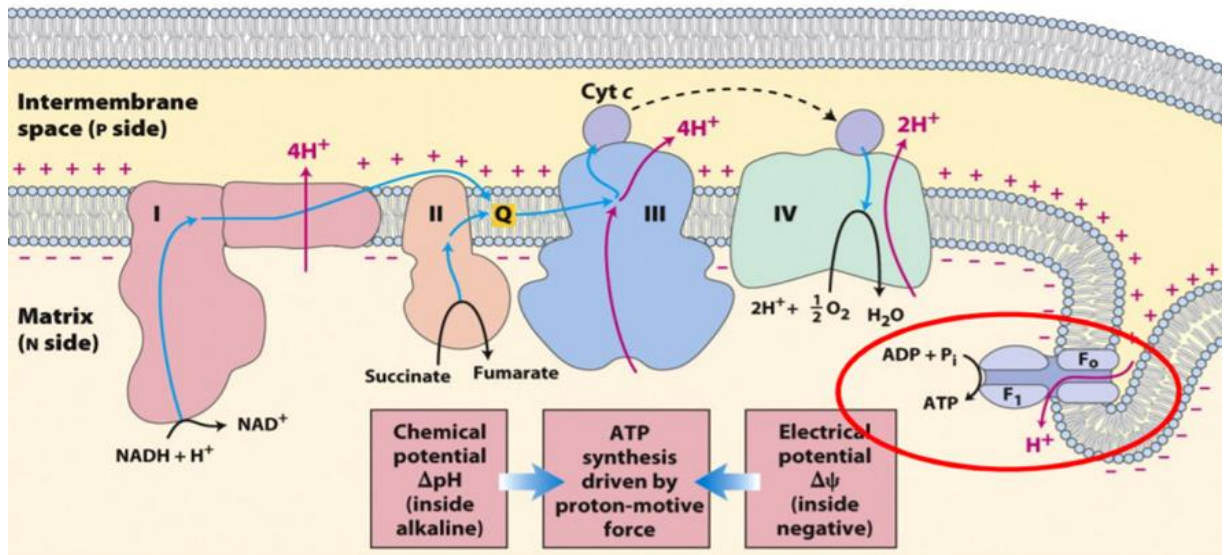
A "resposta à dose bifásica" refere-se à existência de um valor ótimo da dose de FBM definida pela densidade de energia (J/cm²). Assim, quando a dose é aumentada, uma resposta máxima em algum valor é atingida, e se a dose aumentar além desse valor máximo, a resposta diminui, desaparece e é até possível que efeitos negativos ou inibitórios sejam produzidos em fluências muito altas (HAMBLIN, 2017).

Por outro lado, a literatura também reporta uma "resposta à dose trifásica", na qual a dose, quando elevada mais uma vez, a níveis mais altos, efeitos positivos voltam a ser verificados (SHARMA et al., 2011). Portanto, os efeitos podem ser nulos, positivos ou inibitórios de acordo com a dose de energia aplicada sobre o tecido alvo (DELLAGRANA et al., 2018).

O mecanismo de ação primário da FBM mais consistente refere-se à absorção de fótons pela citocromo c oxidase, enzima localizada no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (HUANG et al., 2009; KARU, 2010; CHUNG et al., 2012). Esse fenômeno desencadeia outras vias, gerando respostas secundárias, como aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP), no consumo de oxigênio e metabolismo energético da célula (FERRARESI et al., 2015a); (ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013)(Figura 01), redução do estresse oxidativo e modulação das condições inflamatórias (BARTOS et al., 2016; COSTA et al., 2018) e ainda alteração

na expressão de genes (ALBUQUERQUE-PONTES et al., 2018; GÓRALCZYK et al., 2018; SANTOS et al., 2019).

Figura 01 – Cadeia Transportadora de Elétrons



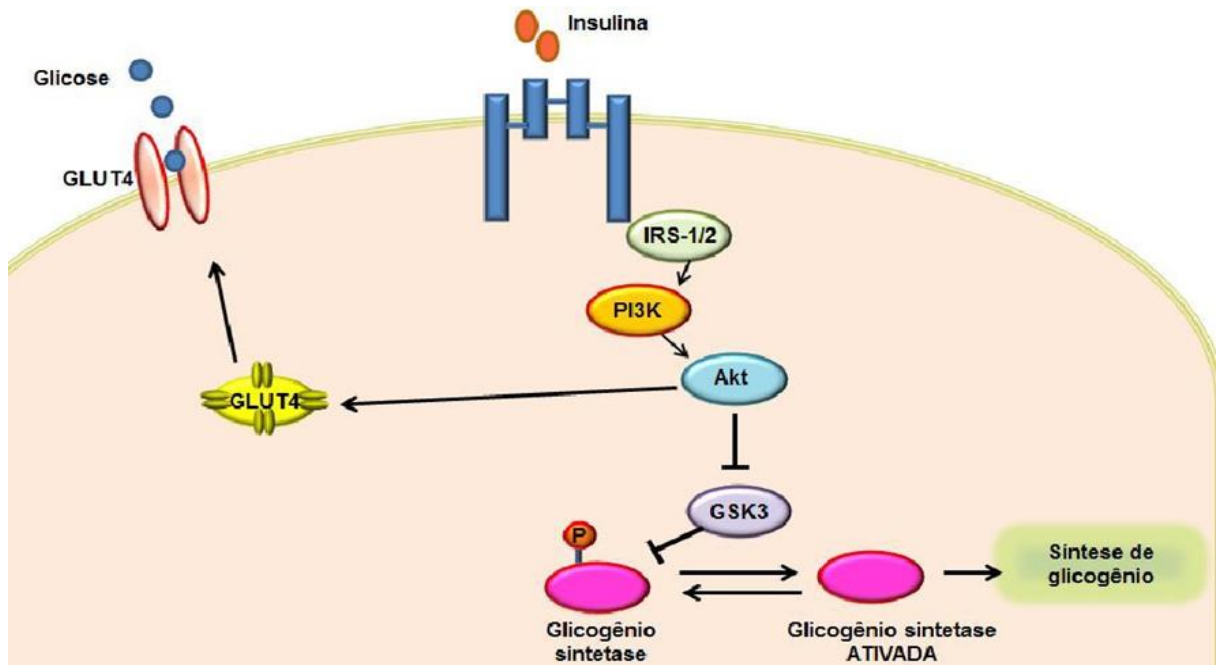
Fonte: NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, 7ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

Nesse contexto, a literatura tem mostrado a aplicabilidade da FBM em diversas condições, sendo evidenciados efeitos positivos no processo de cicatrização dos tecidos (KOUHKHEIL et al., 2019) e incremento do desempenho muscular (ALBUQUERQUE-PONTES et al., 2015; FERRARESI et al., 2015c); o que demonstra efeitos locais da luz. Associado a isso, a FBM também apresenta efeitos sistêmicos, induzindo alterações glicêmicas (FUKUOKA et al., 2016).

Para tanto, a FBM ao ser absorvida pela citocromo c oxidase, desencadeia vias de sinalização para captação de glicose, por meio da proteína quinase B (AKT). Desse modo, a AKT ativa a GLUT4 (transportador de glicose 4), aumentando a translocação da glicose sérica para dentro do conteúdo celular (MASON; RATHMELL, 2011; HUANG et al., 2019) (Figura 02), estimulada pela insulina e de maneira independente por meio do exercício físico (CIARALDI et al., 1995). De forma a controlar a homeostase da glicose (HUANG et al., 2019). Vale ressaltar que a atividade dessa via ainda aprimora a atividade da hexoquinase e frutoquinase (NICOLAU et al., 2005; MASON; RATHMELL, 2011) enzimas participantes da síntese de glicogênio.

O glicogênio é um polissacarídeo, principal forma de armazenamento de glicose nos tecidos, sendo mais abundante no fígado e músculo. O metabolismo do glicogênio é regulado por duas enzimas: glicogênio sintase e glicogênio fosforilase, ambas, quando desfosforiladas são convertidas em formas ativa e inativa, respectivamente, na síntese de glicogênio (NICOLAU et al., 2005).

Figura 02 – Via de ativação AKT e GLUT4



Fonte: Adaptação de POSTAL, B.G. Caracterização dos efeitos e de vias de sinalização de compostos presentes em *Ilex paraguariensis* St. Hil. envolvidas na homeostase da glicose. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Adaptação de POSTAL, B. G. (2015) a partir de PHILIP COHEN e MICHEL GOEDERT, 2004.

Estudo conduzido em animais com resistência à insulina induzida por dieta rica em gordura demonstrou que a FBM melhorou a tolerância à glicose por influenciar na via de sinalização da insulina. Dessa forma, os pesquisadores verificaram que a FBM induziu a fosforilação das proteínas AKT e AS160 (Substrato de AKT160), e ainda reverteu a redução no conteúdo do transportador de glicose 4 (GLUT4) no tecido adiposo epididimal induzida pela dieta hiperlipídica, favorecendo a captação da glicose e, conseqüentemente, o controle glicêmico destes animais. Foi evidenciada ainda diminuição da massa gordurosa epididimal e mesentérica e atenuação da via JNK, contribuindo para redução do processo inflamatório e da resistência insulínica (SILVA et al., 2018).

Assim também, a FBM promove a redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias em células inflamadas e reduz macrófagos com fenótipo M1, que são pró-inflamatórios, bem como a diminuição de prostaglandinas e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Dessa forma, a terapia a laser de baixa intensidade parece favorecer, indiretamente, o controle glicêmico por meio da prevenção de distúrbios metabólicos associados, como a inflamação e o estresse oxidativo (HAMBLIN, 2017; HAMBLIN, 2018).

Yoshimura, Sabino e Ribeiro (2016) ao avaliarem o efeito da FBM por LED (843 nm) em modelo animal de obesidade e resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica, verificaram que a exposição dos animais a seis sessões de irradiação ($5,7 \text{ J/cm}^2$ e 19 mW/cm^2) foi associada à redução na gordura abdominal e nas concentrações séricas de glicose 24 horas após a última sessão.

Um ponto relevante a ser mencionado é que a FBM também tem sido associada à redução de radicais livres em culturas de células submetidas a estresse oxidativo e ao aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), a partir de diferentes doses de radiação. Assim, esta terapia é capaz de prevenir o estresse oxidativo (HAMBLIN, 2018), contribuindo para aumentar a sensibilidade à insulina (IBUKI et al., 2013).

Vieira et al. (2018) evidenciaram que a FBM aumenta a capacidade oxidativa mitocondrial no músculo sóleo e cardíaco de animais submetidos a sessões de exercício físico por meio do incremento da atividade da enzima citrato sintase e redução da lactato desidrogenase, marcador de metabolismo anaeróbio. Destaca-se que o aumento no metabolismo mitocondrial pode diminuir a concentração sérica de glicose (YOSHIMURA; SABINO e RIBEIRO, 2016) com melhoria na sensibilidade à insulina (IBUKI et al., 2013; FUKUOKA et al., 2016).

OLIVEIRA et al. (2019) verificaram que a luz de baixa intensidade reduz os níveis séricos de glicose em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 que realizam exercícios físico moderado, confirmando que a FBM associada ao exercício físico favorece a melhoria na sensibilidade insulínica, quando comparada ao exercício isoladamente (DUARTE et al., 2015).

Sobre este aspecto, PELOW e BAXTER (2013) avaliaram o efeito de diferentes doses de irradiação a laser na região inguinal de ratos diabéticos e verificaram que a dose de $10,2$ a $20,4 \text{ J/cm}^2$ tem potencial para melhoria da doença, fato demonstrado pela redução da frutossamina plasmática, marcador de proteínas glicadas no sangue. Fukuoka et al. (2016) observaram redução na concentração

sérica de glicose de animais diabéticos após irradiação a laser de baixa potência (20 J/cm²).

O processo de FBM também induz a síntese de glicogênio muscular, o que pode ser decorrente da modulação da expressão de genes que codificam para proteínas específicas e chaves nesse processo, como as enzimas glicogênio sintase e fosfoglicomutase (FERRARESI et al., 2015c; FERRARESI et al., 2016). Tatmatsu-Rocha et al. (2017) verificaram que o conteúdo de glicogênio hepático e muscular foi, respectivamente, 296% e 706% menor nos animais diabéticos controle em relação aos tratados com irradiação a laser e Patrocínio et al. (2013) observaram que a terapia a laser de baixa potência reduziu a depleção do glicogênio muscular induzida pelo exercício físico.

Outro aspecto importante é que a FBM é capaz de ativar a via de sinalização Akt em células neuronais, induzindo efeitos anti-apoptóticos. Assim, o processo de FBM parece ser benéfico na proteção contra neurotoxicidade induzida pelo excesso de glicose associada ao diabetes mellitus. Além disso, a FBM tem sido indicada como possível estratégia terapêutica coadjuvante no tratamento de doenças neuronais (LIANG; LIU; XING, 2012; OLIVEIRA; SANTOS-EICHLER; DALE, 2019).

PROPOSIÇÃO

O laser foi criado na década de 60, a partir de então essa e outras fontes de luzes com semelhante espectro de radiação como o LED foram desenvolvidas e aplicadas para diversos fins. No campo da medicina, os lasers de alta potência foram rapidamente introduzidos para realização de cirurgias com o intuito de cortar, e até mesmo destruir tecidos. Por conseguinte, com novos estudos, a possibilidade terapêutica dessa luz alargou-se, surgindo a fotobiomodulação com o uso do laser de baixa intensidade e o LED, os quais promoveram cicatrização de feridas, neovascularização e melhora do desempenho muscular.

Atualmente, além dos efeitos já citados da fotobiomodulação, os quais encontram-se em nível local, projetam-se novas perspectivas de aplicação da luz à elucidação dos efeitos terapêuticos em nível sistêmico. Portanto, o interesse em verificar o comportamento sérico da glicose e a síntese de glicogênio no organismo vivo. Dessa forma, a apoiar outros estudos com essa problemática e, principalmente, contribuir para uma nova alternativa de tratamento para pacientes diabéticos.

Nesse intuito, a hipótese do presente estudo considerou que a FBM aplicada sobre os músculos de ratos não diabéticos diminui a glicemia (efeito sistêmico) e aumenta a concentração de glicogênio dos músculos irradiados.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo experimental, aleatorizado, com uso de terapia placebo (*sham*). O desenho do estudo foi escolhido para garantir que haja imparcialidade na alocação dos animais em cada grupo experimental e na aplicação das diferentes intervenções ou terapias (doses de fotobiomodulação). Todos os animais foram posicionados da mesma maneira para receberem a irradiação por fotobiomodulação, seja ela placebo (*sham*) ou efetiva (10 J/cm², 30 J/cm², 60 J/cm²).

Para este estudo, foram utilizados 24 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*), machos, com idade de oito a 14 semanas, não diabético, com massa corpórea entre 350 a 550 gramas, fornecidos pelo biotério da Universidade do Sagrado Coração. Os animais foram alocados no biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru/SP, em caixas plásticas, contendo três animais por caixa para que não houvesse restrição de movimento, em temperatura ambiente de 22°C, com regime de 12 horas de claro e escuro, controlado por temporizador. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Brasil, São Paulo, SP, sob o registro de número 1900038 (ANEXO A), e seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA-MCT para a conduta em pesquisa experimental com animais.





Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos igualmente e aleatoriamente em quatro grupos para se investigar os efeitos da dose-reposta da fotobiomodulação por LEDs de baixa intensidade sobre os níveis glicêmicos em função do tempo (tempo-resposta), bem como a concentração de glicogênio muscular 24 horas após a fotobiomodulação. A figura 3 representa o desenho experimental.

- *Sham* (n=6): animais não irradiados por fotobiomodulação efetivamente (apenas simulação) sobre os membros posteriores e dorso;
- Fotobiomodulação 10 J/cm² (n=6): animais irradiados com dose de 10 J/cm² sobre os membros posteriores e dorso;
- Fotobiomodulação 30 J/cm² (n=6): animais irradiados com dose de 30 J/cm² sobre os membros posteriores e dorso;

- Fotobiomodulação 60 J/cm² (n=6): animais irradiados com dose de 60 J/cm² sobre os membros posteriores e dorso.

Figura 03– Desenho experimental

		Tempo-resposta				Glicogênio	
		Glicemia					
Dose-resposta	Sham	 6	Pré/	1 hora/	3 horas/	6 horas	24 horas
	FBM 10 J/cm ²	 6	Pré/	1 hora/	3 horas/	6 horas	24 horas
	FBM 30 J/cm ²	 6	Pré/	1 hora/	3 horas/	6 horas	24 horas
	FBM 60 J/cm ²	 6	Pré/	1 hora/	3 horas/	6 horas	24 horas

Fonte: Autoria Própria

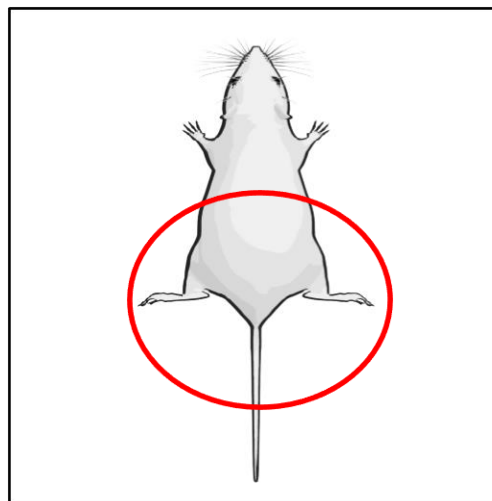
Fotobiomodulação (FBM) por LEDs (light-emitting diode therapy) de baixa intensidade. Dose-resposta da FBM (sham, 10 J/cm², 30 J/cm², 60 J/cm²) e tempo-resposta (pré-irradiação, 1h após, 3h após, 6h após).

Fotobiomodulação por LED (*light-emitting diodes*) de baixa intensidade

A irradiação dos animais com fotobiomodulação por LEDs (*light-emitting diode*) foi realizada com um arranjo de 69 LEDs [35 vermelhos (630 ± 10 nm); 34 infravermelhos (850 ± 20 nm)] com área de 40 cm², especialmente desenvolvido para esse estudo. O arranjo de LEDs foi posicionado a uma distância de 45 mm do animal ou do medidor de potência óptica PM100D Thorlabs® equipado com sensor S130C (área de 0,7 cm²), o qual foi utilizado para calibrar os parâmetros da fotobiomodulação. A irradiação durou 90 segundos (10 J/cm²), 270 segundos (30 J/cm²) ou 540 segundos (60 J/cm²), de acordo com os parâmetros fixos e descritos na tabela 1 e grupos experimentais da figura 3. A terapia placebo (apenas simulação) teve duração de 90 segundos. Os animais foram imobilizados manualmente, sem o uso de anestesia sobre o dorso, e posicionados em decúbito ventral sob o arranjo de LEDs, o qual irradiou a região do dorso, glúteo e membro posteriores dos animais (Figuras 04). As

doses utilizadas nos animais seguiram propostas de ensaios clínicos anteriores (FUKUOKA et al.2016; SILVA et al., 2018; PELOW e BAXTER, 2013).

Figura 04 – FMB por LED



Fonte: Autoria própria

Tabela 1- Parâmetros da fotobiomodulação por LEDs (*light-emitting diode*) de baixa intensidade.

(continua)

Número de LEDs (arranjo): 69 (34 infravermelho-IR e 35 vermelho-RED)
Comprimento de onda: 850 ± 20 nm (IR) and 630 ± 10 nm (RED)
Área de cada LED: 0,2 cm ²
Frequência de pulso: contínuo
Potência óptica de cada LED: 50 mW (IR) e 25 mW (RED)
Potência óptica (arranjo): 1.700 mW (IR) e 875 mW (RED)
Potência óptica (arranjo) sobre os animais: 70 mW (IR) e 10 mW (RED)
Tamanho do arranjo de LEDs: 40 cm ²
Densidade de potência (sobre o dorso dos animais): 114 mW/cm ²
Tempo de tratamento: 90 seg/ 270 seg/ 540 seg
Densidade de energia sobre o dorso dos animais: 10 J/cm ² ; 30 J/cm ² ; 60 J/cm ²
Modo de aplicação: sem contato
Distância aos animais ou ao medidor de potência óptica: 45 mm

Fonte: Autoria Própria

Grupo Sham não recebeu a fotobiomodulação de forma efetiva, apenas simulação.

Todos os animais foram submetidos à tricotomia dos membros inferiores e dorso até a região lombar baixa, evitando que os pelos dos animais interferissem na aplicação da fotobiomodulação.

Glicemia

A coleta de sangue da cauda dos animais foi realizada por meio da perfuração cutânea com lanceta estéril, uma única vez em cada momento de avaliação. A dosagem de glicose foi conduzida em glicosímetro digital (Accu-Chek, Roche) com a análise de uma gota de sangue. Essa avaliação ocorreu nos momentos pré-irradiação, 1 hora, 3 horas e 6 horas após a fotobiomodulação por LEDs de baixa intensidade. Vale ressaltar que os animais receberam água e ração *ad libitum* até o momento imediatamente antes da FBM. Após a irradiação, todos os animais ficaram em jejum e sem acesso à água por seis horas (última coleta sanguínea para mensurar a glicemia). Os dados foram analisados por 2 pesquisadores cegados para a coleta de dados.

Procedimentos de anestesia, cirurgia e sacrifício

Todos os animais foram submetidos à anestesia, cirurgia e sacrifício após 24 horas da irradiação por fotobiomodulação. Para a anestesia intraperitoneal, foi utilizada a proporção de 40 mg/Kg (massa do animal) de ketamina (Dopalen; Vetbrands; São Paulo; Brasil), e 20 mg/Kg (massa do animal) de xilazina (Anasedan; Vetbrands; São Paulo; Brasil) (MARTIGNAGO *et al.*, 2019).

Após anestesia, a cirurgia foi realizada para a retirada do músculo glúteo máximo, o qual foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer -80°C até as análises de glicogênio muscular. Em seguida, após a cirurgia, os animais foram sacrificados com uma dose letal de anestésico (duas vezes a concentração utilizada para anestesia inicial) (MARTIGNAGO *et al.*, 2019).

Os sinais vitais (batimentos cardíacos, frequência respiratória e reflexos) foram avaliados para a certificação da morte dos animais.

Glicogênio muscular

O glicogênio muscular foi mensurado em 300 mg (em média) de tecido, o qual foi pesado em balança analítica (METTLER TOLEDO, modelo XS204) e homogeneizado com 6N NaOH na proporção de 50 mg/ ml. Uma curva padrão foi preparada usando etanol absoluto (100%), K₂SO₄ (10%), fenol (4,1%) e 1 mM de glicose (2%) de acordo com DUBOIS *et al.* (1951). A densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro a 480 nm (HACH DR, modelo 4000U UV-VIS) e os dados foram normalizados por miligrama de tecido muscular de cada animal. Todos os procedimentos foram realizados por pesquisador cegado para os resultados de glicemia dos animais, e os dados foram analisados por pesquisador cegado para a coleta de dados.

Análise estatística

As variáveis de desfechos foram analisadas quanto à normalidade de distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Análise de variância de uma via (ANOVA one-way) foi realizada para comparação intergrupos para o desfecho glicogênio. Para a glicemia, foi realizada uma análise de variância de duas vias (ANOVA two-way) de medidas repetidas de (dose-resposta: 4 diferentes tratamentos; e tempo-resposta: 4 níveis ou medidas repetidas – pré irradiação, 1 hora, 3 horas e 6 horas após a irradiação) para comparação intergrupos e intragrupos. Quando encontrada interação significativa, foi utilizado o *post hoc* de Tukey HSD.

A variabilidade da média da glicemia foi calculada, a partir da média dos valores glicêmicos ao longo de 6 horas para cada grupo e depois o desvio padrão dessas médias. As análises de correlação entre a glicemia e a concentração de glicogênio foram realizadas utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson. Para essas análises, foi utilizado o desvio-padrão médio da glicemia de cada animal ao longo das 6 horas (momentos pré, 1h, 3h, 6h) após início do jejum e irradiação com FBM. O nível de significância adotado foi de 5%. O programa estatístico utilizado para a análise dos dados foi o Statistica.

RESULTADOS

A figura 05 apresenta o efeito da fotobiomodulação (FBM) por LEDs sobre os níveis glicêmicos dos animais nas doses de 10 J/cm², 30J/cm², 60J/cm² e no grupo sham. Para cada grupo foi verificado o valor da glicemia em 04 momentos: pré-irradiação, 1h, 3h e 6h após FBM.

Verificou-se no grupo sham que houve diferença significativa na concentração sérica de glicose entre os momentos pré, 1h após (p=0,0001) e 3h (p=0,0001) após a simulação da irradiação. Houve aumento da glicemia 1h e 3h após a simulação da irradiação em relação ao momento pré. Para o grupo de animais submetidos à FBM na dose 10 J/cm², não houve diferença estatística na glicemia entre os momentos pré, 1h (p=0,999), 3h (p=0,096) e 6 h (p=0,999) após a irradiação. Para o grupo tratado com 30 J/cm² houve diferença significativa nos níveis glicêmicos dos momentos pré, 1h (p=0,018) e 3h (p=0,0003) após a irradiação com elevação da glicose sérica nesses momentos. Por fim, foi verificada diferença significativa entre os níveis glicêmicos dos animais submetidos à dose de 60 J/cm² nos momentos pré e 1h após irradiação (p=0,0002), retornando aos níveis basais (pré-irradiação) nos momentos 3h e 6h após a FBM.

Quanto à análise intergrupos, houve diferença significativa entre os níveis glicêmicos dos animais no momento de 1h após a FBM apresentando-se mais elevada no grupo sham em relação ao grupo de 10 J/cm² (p=0,0002) e grupo de 30 J/cm² (p=0,002). Com a dose de 60 J/cm² a glicose elevou-se 1h após a FBM, assumindo valores semelhantes ao sham e estatisticamente maior que dose de 10J/cm² (p=0,002) e 30 J/cm² (p=0,004), nesse momento. Após 3h, foi verificado maior valor da glicemia do grupo sham comparado ao grupo 10 J/cm² (p= 0,0009). Os demais grupos 30 e 60 J/cm² obtiveram valores glicêmicos menores que o grupo sham, porém sem diferenças estatísticas. Após 6h da FBM, a glicose sérica assumiu valores semelhantes ao basal para todos os grupos. Esses resultados estão representados na figura 06.

Figura 05- Efeito da fotobiomodulação por LEDs sobre os níveis glicêmicos de ratos não diabéticos.

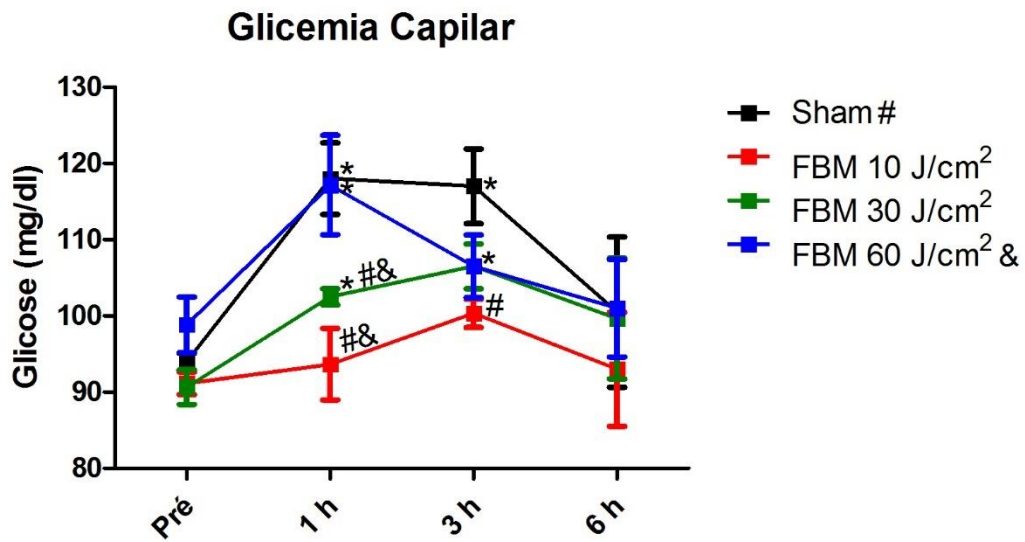


Figura 05. * Diferença significativa ($p < 0,05$) intragrupo (comparação entre o momento pré e os momentos 1h, 3h e 6h). #Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo sham. &Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo 60 J/cm².

A figura 06 mostra a concentração muscular de glicogênio dos animais do grupo controle e daqueles expostos à fotobiomodulação. Verificou-se maior concentração de glicogênio muscular dos animais tratados com as três diferentes doses de FBM em relação ao grupo sham ($p < 0,001$). Observou-se ainda que os animais submetidos às doses de 10 J/cm^2 e 60 J/cm^2 apresentaram maior concentração muscular de glicogênio em relação ao grupo 30 J/cm^2 ($p < 0,001$).

Figura 06- Efeito da fotobiomodulação por LEDs sobre a concentração muscular de glicogênio de ratos não diabéticos.

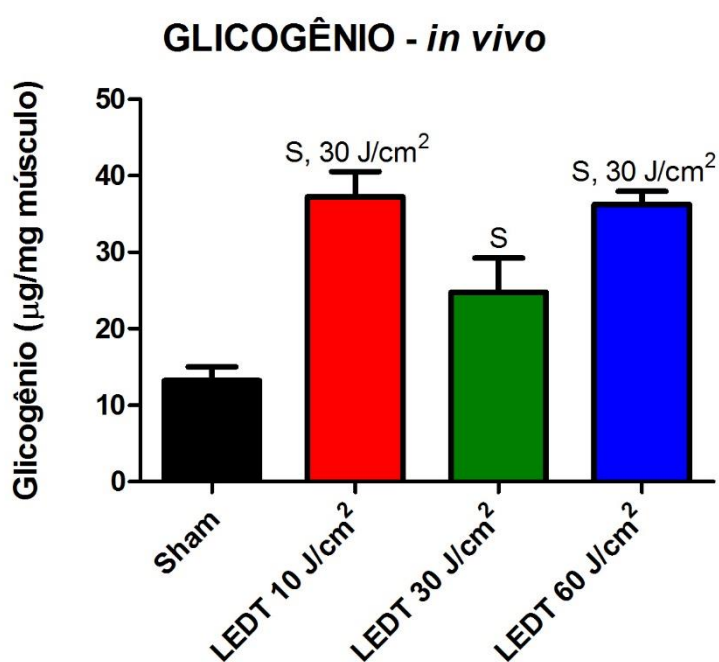


Figura 06. "S" diferenças significativas ($p < 0,05$) entre sham versus 10 J/cm^2 , sham versus 30 J/cm^2 , sham versus 60 J/cm^2 . " 30 J/cm^2 " diferença significativa ($p < 0,05$) entre 10 J/cm^2 versus 30 J/cm^2 , e 30 J/cm^2 versus 60 J/cm^2 .

A tabela 2 apresenta a variabilidade média dos níveis glicêmicos de cada animal ao longo de 6 horas (momentos pré irradiação, 1h, 3h e 6h após irradiação) de cada grupo experimental: 13,03 mg/dL (sham); 5,92 mg/dL (10 J/cm²); 7,77 mg/dL (30 J/cm²) e 9,07 mg/dL (60 J/cm²). No entanto, excluindo o tempo de 1h após irradiação para o grupo 60 J/cm², é possível verificar uma menor variabilidade dos níveis glicêmicos (5,54 mg/dL), algo que não ocorreu para o grupo 30 J/cm² (9,06 mg/dL).

Tabela 2 - Variabilidade média dos níveis glicêmicos dos animais ao longo de 6 horas.

Dose	Variabilidade glicêmica (mg/dL)
Sham	13,03
10 J/cm ²	5,92
30 J/cm ²	7,77
60 J/cm ²	9,07
60 J/cm ²	5,54*

Fonte: Autoria própria

*Valor da variabilidade média da glicemia excluindo o tempo de 1 hora após a FBM à dose de 60 J/cm².

Na figura 07, verificou-se que houve uma associação muito significativa, e inversamente proporcional (hipótese do estudo) entre a variabilidade dos níveis glicêmicos e a quantidade de glicogênio muscular. Quanto menor a variabilidade dos níveis glicêmicos de cada animal ao longo de 6 horas, maior foi a concentração muscular de glicogênio dos animais submetidos à fotobiomodulação quando comparados ao grupo sham. A correlação mais forte entre essa variabilidade da glicemia e concentração de glicogênio ocorreu para a dose de 10 J/cm² (r de Pearson= -0,94; p<0,001) (painel A), seguido pela dose de 30 J/cm² (r de Pearson= -0,84; p<0,001) (painel B), e 60 J/cm² (r de Pearson= -0,73; p=0,006) (painel C). A correlação entre os níveis glicêmicos e concentração de glicogênio muscular em modelo com todos os grupos (as 3 doses de FBM) foi de r de Pearson= -0,70, p<0,001 (painel D).

Figura 07- Efeito da variabilidade dos níveis glicêmicos sobre a concentração muscular de glicogênio de ratos não diabéticos submetidos ao tratamento sham ou fotobiomodulação por LEDs com doses de 10, 30 e 60 J/cm².

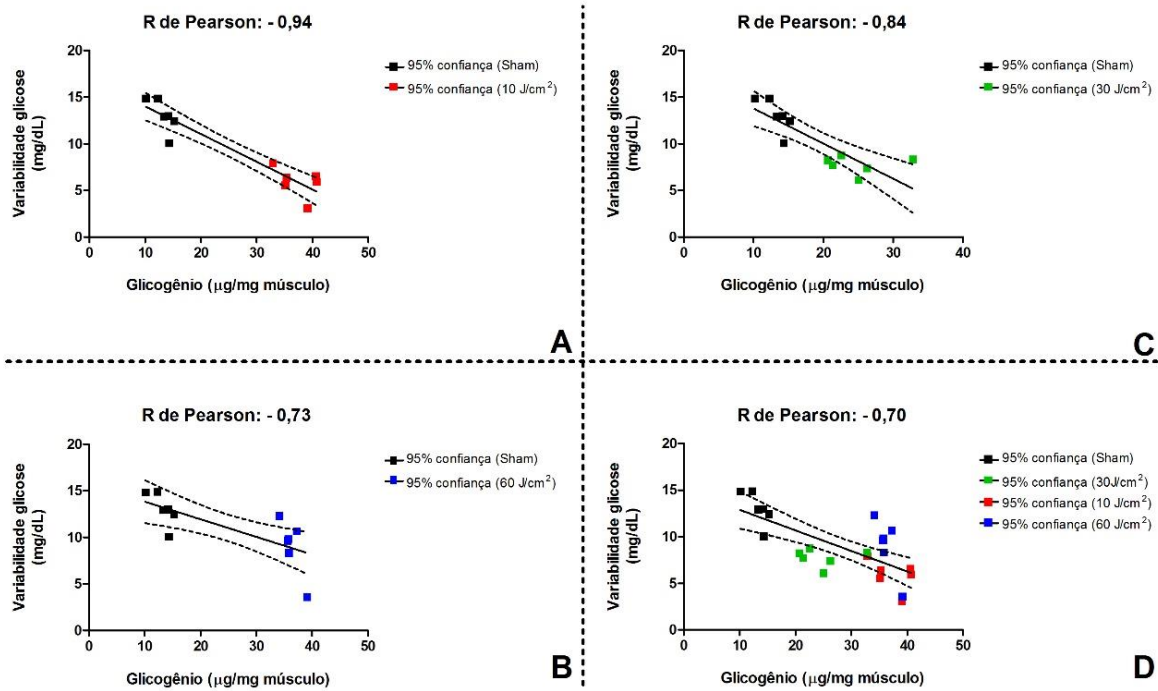


Figura 07. Painel A: relação entre variabilidade glicêmica e concentração de glicogênio muscular ao longo de 6 horas entre os grupos sham e 10J/cm². Painel B: relação entre variabilidade glicêmica e concentração de glicogênio muscular ao longo de 6 horas entre os grupos sham e 30J/cm². Painel C: relação entre variabilidade glicêmica e concentração de glicogênio muscular ao longo de 6 horas entre os grupos sham e 60J/cm². Painel D: relação entre variabilidade glicêmica e concentração de glicogênio muscular ao longo de 6 horas entre os grupos sham e todas as doses de fotobiomodulação. Abreviações: R de Pearson = Coeficiente de Correlação de Pearson.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito de dose e tempo resposta da fotobiomodulação (FBM) por LEDs de baixa intensidade sobre a glicemia e a concentração muscular de glicogênio em ratos não diabéticos, bem como a existência de relação entre estas variáveis de desfecho para demonstrar a ação sistêmica da FBM. A dose de 10 J/cm² promoveu os menores níveis glicêmicos e a maior homeostasia glicêmica, ou seja, menor flutuação ou variação dos níveis glicêmicos ao longo de 6 horas, comparado aos grupos sham, 30 e 60 J/cm² (dose e tempo-resposta). No entanto, vale ressaltar que, excluindo os resultados de 1h para o grupo de 60 J/cm², a variabilidade dos níveis glicêmicos foi muito similar ao grupo de 10 J/cm². Também, os grupos de 10 J/cm² e 60 J/cm² foram os grupos com o maior incremento de glicogênio muscular, enquanto o grupo irradiado com 30 J/cm² diminuiu significativamente seus níveis de glicogênio muscular comparado às doses de 10 J/cm² e 60 J/cm², caracterizando assim uma dose-resposta trifásica da FBM. Por fim, houve uma correlação negativa, forte e significativa entre a variabilidade dos níveis glicêmicos (ao longo de 6h) e a síntese (concentração) de glicogênio muscular, indicando que quanto menor a variação glicêmica, maior a síntese de glicogênio muscular.

A dose 10 J/cm² induziu menor glicemia e discretas alterações glicêmicas após os animais serem submetidos ao jejum e à FBM, ou seja, a glicemia foi mantida a valores próximos aos níveis basais, podendo, portanto, ser considerada benéfica para o controle glicêmico. Nesse contexto, Peplow e Baxter, 2013) verificaram que doses semelhantes de irradiação por laser de baixa intensidade (10,2 e 20,4 J/cm²) aplicados na região inguinal de ratos diabéticos tem potencial para amenizar a doença, fato demonstrado pela redução da frutossamina plasmática, um marcador de proteínas glicadas no plasma sanguíneo. Os resultados de Fukuoka et al., 2016) também corroboram esses achados prévios, pois observaram uma redução na concentração sérica de glicose de animais diabéticos após fotobiomodulação por laser de baixa intensidade na região de glândulas salivares.

A FBM parece estimular a função mitocondrial por meio do aumento da atividade da citocromo c oxidase, enzima chave da cadeia transportadora de elétrons, favorecendo a síntese de ATP nesta organela. Nesse contexto, Vieira et al. (2018) verificaram que a FBM aumenta a atividade da citrato sintase, enzima chave do ciclo de Krebs, que está intimamente relacionada à citocromo c oxidase. Dessa forma,

parece ocorrer maior atividade deste ciclo com a FBM, aumentando a utilização de glicose para síntese de ATP, o que pode contribuir para sua redução no sangue. Também, a irradiação por LEDs na faixa do infravermelho pode melhorar a resistência insulínica, contribuindo para o controle glicêmico nos animais, como previamente demonstrado por nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2018).

Outros mecanismos pelos quais a fotobiomodulação pode ter contribuído para a redução da glicemia dos animais diz respeito à atenuação da via JNK (quinase c-Jun n-terminal), relacionado ao desenvolvimento de resistência à insulina. Além disso, a FBM pode estimular a fosforilação das proteínas quinase B (AKT) e substrato da AKT 160 (AS160), com maior translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática e consequente maior captação de glicose para o meio celular, reduzindo suas concentrações séricas (SILVA et al., 2018). Corroborando com esses mecanismos de ação, outro estudo *in vitro* de diabetes induzida por neurotoxicidade da glicose em neurônios verificou que a FBM é capaz de ativar as vias de sinalização da AKT (OLIVEIRA; SANTOS-EICHLER; DALE, 2019), como previamente demonstrado por nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2018).

Alguns estudos clínicos randomizados já utilizaram a FBM para o controle dos níveis glicêmicos. OLIVEIRA et al. (2019) avaliaram o efeito da FBM por LEDs (850 nm) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 e verificaram que a combinação entre exercício físico e FBM promoveu redução na concentração sérica pode ser decorrente da melhoria da resistência à insulina, já evidenciada previamente por redução nos valores do índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance*) (DUARTE et al., 2015; FUKUOKA et al., 2016; SILVA et al., 2018), ou seja, a FBM pode ter aumentando a responsividade dos tecidos à insulina como já descrito previamente (YOSHIMURA; SABINO; RIBEIRO, 2016).

Além dos mecanismos de ação da FBM aplicada sobre o tecido muscular para o controle dos níveis glicêmicos previamente mencionados, o presente estudo investigou se a glicose sanguínea, uma vez translocada para o meio intracelular, poderia ser utilizada para a síntese de glicogênio no musculoesquelético. Os animais submetidos à fotobiomodulação apresentaram maiores concentrações de glicogênio muscular comparados ao grupo sham, pois os grupos tratados com as doses 10 e 60 J/cm² tiveram as maiores concentrações de glicogênio. Resultados semelhantes de incremento de síntese de glicogênio muscular foram reportados previamente quando a FBM foi aplicada diretamente sobre o tecido muscular submetido a exercício físico (PATROCINIO et al., 2013; FERRARESI et al., 2015c), bem como quando aplicada

diretamente sobre o pâncreas, promovendo um efeito sistêmico (TATMATSU-ROCHA et al., 2017).

Nos estudos prévios que combinaram exercício físico e FBM (PATROCINIO et al., 2013; FERRARESI et al., 2015c) o transporte de glicose para dentro da célula provavelmente foi otimizado, não apenas pelo exercício físico, que é conhecido por melhorar a sensibilidade dos tecidos à insulina, mas também por uma maior fosforilação de AKT (proteína quinase B) e de seu substrato (AS160) para finalmente proporcionar maior translocação do transportador de glicose dependente de insulina GLUT-4 (SILVA et al., 2018) No presente estudo, a FBM pode ter estimulado o transporte da glicose para dentro da célula via GLUT-4 sem qualquer ação de exercício físico (SILVA et al., 2018), bem como estimulado a velocidade de fosforilação da glicose via glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato e difosfoglicose de uridina (UDP-glicose) para a síntese de glicogênio (PERSEGHIN et al., 1996). Ainda, nesse processo de síntese de glicogênio, a energia da FBM aplicada, de acordo com a dose-resposta, pode ter alterado a relação entre as formas ativa (I) e inativa (D) da enzima glicogênio sintase (IVY, 1991), favorecendo a forma ativa e uma maior síntese de glicogênio.

O comportamento trifásico de síntese de glicogênio muscular estimulada pela FBM foi intrigante e sem comparações diretas na literatura. Porém, comportamentos trifásicos já foram reportados na literatura previamente (SHARMA et al., 2011). Os autores verificaram que a FBM por laser de baixa intensidade (810 nm), induziu um aumento significativo na produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) em neurônios corticais primários de ratos com dose de 3 J/cm². Dose de 10J/cm² diminuiu concentração de EROs, e dose de 30 J/cm² estimulou um segundo aumento significativo na concentração EROs comparado a 10 J/cm².

A análise de correlação entre a variabilidade dos níveis glicêmicos dos animais de todos os grupos, e a concentração de glicogênio muscular, mostrou uma correlação inversamente proporcional (negativa) entre essas variáveis de desfecho. Ou seja, houve maior síntese de glicogênio à medida que houve menor variabilidade dos níveis glicêmicos dos animais. No entanto, destacamos também as comparações entre o grupo sham e cada uma das doses de FBM aplicadas. Mais uma vez, comparado ao grupo sham (padrão esperado de resposta fisiológica), foi identificado que quanto menor a variabilidade dos níveis glicêmicos dos animais irradiados com FBM (destaque para 10 J/cm²), maior foi a síntese de glicogênio muscular [Fig 04]. Apesar da dose de 60 J/cm² demonstrar o menor valor de correlação (r de Pearson -

0,73) entre os grupos de FBM, quando se exclui os dados de 1h, temos uma variabilidade glicêmica significativamente menor que resulta em maior correlação (r de Pearson de -91; $p < 0,001$).

Os resultados do presente estudo sugerem que a FBM pode ter um papel muito importante no controle dos níveis glicêmicos (efeito sistêmico), e o seu possível mecanismo de ação é a indução de maior síntese de glicogênio muscular independente da realização de exercício físico. Esses resultados podem ter grande importância para futuros estudos sobre diabetes mellitus, ou mesmo na recuperação muscular pós-exercício, onde a síntese de glicogênio se faz importante.

CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou uma clara dose-resposta e tempo-resposta da fotobiomodulação (FBM) por LEDs de baixa intensidade no controle glicêmico (efeito sistêmico) e aumento de síntese de glicogênio muscular em ratos. Esses resultados podem nortear estudos futuros que investiguem mais profundamente os mecanismos moleculares de regulação do metabolismo da glicose e síntese de glicogênio mediado pela FBM em modelos animais e possivelmente em humanos. Além disso, amplia as alternativas de doses efetivas (10, 30 e 60 J/cm²), as quais podem ser verificadas posteriormente em estudos com animais diabéticos.

ANEXO -A



RESOLUÇÃO - PARECER

COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA

PROTOCOLO Nº - 1900038

TÍTULO DO PROJETO

FEITOS AGUDOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A GLICEMIA E A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO MUSCULAR DE RATOS.

RESPONSÁVEL

Nome completo	Cleber Ferraresi
Instituição	Universidade Brasil
Unidade	Itaquera
Departamento	Engenharia Biomédica

RESOLUÇÃO – PARECER

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 12/09/2019


, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura – coordenadora da comissão

Cássia Maria Barroso Orlandi


ANEXO B

Comprovante de submissão do artigo

 JPHOTOBIOLOG_2019_1467 | Full length article

Can photobiomodulation therapy (PBMT) control blood glucose levels and alter muscle glycogen synthesis?

Cleber Ferraresi | Post-graduation program in Biomedical Engineering, Universidade Brasil, SP, Brazil, Rua Carolina Fonseca, 235, São Paulo, Brazil, Brazil.

 Zip File

Status: **Under Review (9 days)** | Submitted: **17/Nov/2019**

Overview



Files



Messages

Other Authors [Show Details](#)

kenia mendes (Post-Graduation Program in Biomedical Engineering, Universidade Brasil, São Paulo, Brazil), Rodrigo Leal de Paiva Carvalho (Laboratory of Physiology and Human Performance, São Paulo State University – UNESP, Bauru, São Paulo), Geraldo Marco Rosa Junior (Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, São Paulo), Beatriz Antonias Tavares (Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, São Paulo), Luis Henrique Simionato (Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, São Paulo), Carlos Henrique Fachin Bortolucci (Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru, São Paulo), Claudio Tellez (Post-Graduation Program in Biomedical Engineering, Universidade Brasil, São Paulo)

Contact Ed

Abstract

Photobiomodulation therapy (PBMT) has many effects on the energy metabolism of musculoskeletal tissue, such as increased glycogen and adenosine triphosphate synthesis. In addition, these effects may be due to a systemic blood glucose control. Twenty-four Wistar rats were randomly and equally allocated to four groups: sham, PBMT 10J/cm², PBMT 30J/cm² and PBMT 60 J/cm². The animals were fasting for 6 hours for blood glucose evaluations during the pre-irradiation period, 1h, 3h and 6h after PBMT. Muscle glycogen synthesis was measured 24h after PBMT. This PBMT used a cluster of 69 LEDs (light-emitting diodes) with 35 red (630 ± 10 nm) and 34 infrared (850 ± 20 nm); 114 mW/cm² for 90s (10J/cm²), 270s (30J/cm²), 540s (60J/cm²) applied on the back and hind legs of the animals. The 10J/cm² group showed lower blood glucose levels and variability over 6 hours (5.92 mg/dL) compared to the sham (13.03 mg/dL), 30J/cm² (7.77 mg/dL) and 60 J/cm² (9.07 mg/dL) groups. The PBMT groups had the greatest increase in muscle glycogen (10 J/cm² > 60 J/cm² > 30 J/cm² > sham), characterizing a triphasic dose-response of PBMT. There was a strong negative correlation between blood glucose variability over 6 hours and muscle glycogen concentration for 10J/cm² group (r = -0.94; p<0.001) followed by 30 J/cm² group (r = -0.84; p<0.001) and 60J/cm² group (r = -0.73; p<0.006). The results suggest that PBMT can play a very important role in the control of blood glucose levels, and its possible mechanism of action is the induction of greater muscle glycogen synthesis independently of physical exercise.

Keywords

low-level laser therapy, LED therapy, glycogen, blood glucose, diabetes mellitus

Highlights

- First time that photobiomodulation therapy (PBMT) controlled blood glucose levels (systemic effect) after muscle irradiation without exercise;
- PBMT controlled blood glucose levels and its variability with a biphasic dose-response (10 J/cm² best dose);
- PBMT increased muscle glycogen synthesis with a triphasic dose-response (10 and 60 J/cm² best doses);
- Very strong and negative correlation between blood glucose control and muscle glycogen synthesis (supposed mechanism of action).

Additional Information

 View

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE-PONTES, G. M. et al. Effect of pre-irradiation with different doses, wavelengths, and application intervals of low-level laser therapy on cytochrome c oxidase activity in intact skeletal muscle of rats. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 1, p. 59-66, 2015. DOI: 10.1007/s10103-014-1616-2.

ALBUQUERQUE-PONTES, G. M. et al. Photobiomodulation therapy protects skeletal muscle and improves muscular function of mdx mice in a dose-dependent manner through modulation of dystrophin. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 4, p. 755-764, 2018. DOI: 10.1007/s10103-017-2405-5.

ANTONIALLI, F. C. et al. Phototherapy in skeletal muscle performance and recovery after exercise: effect of combination of super-pulsed laser and light-emitting diodes. **Lasers in medical science**, v. 29, n. 6, p. 1967-1976, 2014. DOI: 10.1007/s10103-014-1611-7.

AQUINO, A. E., JR. et al. Can low-level laser therapy when associated to exercise decrease adipocyte area? **J Photochem Photobiol B**, v. 149, p. 21-6, Aug 2015. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.04.003.

BARTOS, A. et al. Pre-conditioning with near infrared photobiomodulation reduces inflammatory cytokines and markers of oxidative stress in cochlear hair cells. **Journal of biophotonics**, v. 9, n. 11-12, p. 1125-1135, 2016. DOI: 10.1002/jbio.201500209.

CHUNG, H. et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng**, v. 40, n. 2, p. 516-33, Feb 2012. DOI: 10.1007/s10439-011-0454-7.

CIARALDI, T. P. et al. Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. Regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. **J Clin Invest**, v. 96, n. 6, p. 2820-7, Dec 1995. DOI: 10.1172 / JCI118352

COSTA, M. S. et al. Photobiomodulation reduces neutrophil migration and oxidative stress in mice with carrageenan-induced peritonitis. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 9, p. 1983-1990, 2018. DOI: 10.1007/s10103-018-2569-7.

DELLAGRANA, R. A. et al. Dose-response effect of photobiomodulation therapy on neuromuscular economy during submaximal running. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 2, p. 329-336, 2018. DOI: 10.1007/s10103-017-2378-4.

DE MARCHI, T. et al. Does photobiomodulation therapy is better than cryotherapy in muscle recovery after a high-intensity exercise? A randomized, double-blind, placebo-

controlled clinical trial. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 2, p. 429-437, 2017. DOI: 10.1007/s10103-016-2139-9.

DUARTE, F. O. et al. A. Can low-level laser therapy (LLLT) associated with an aerobic plus resistance training change the cardiometabolic risk in obese women? A placebo-controlled clinical trial. **J Photochem Photobiol B**, v. 153, p. 103-110, Sep 2 2015. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.026.

DUBOIS, M. et al. A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. **Nature**, v. 168, p. 167-167, 1951.

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 Med*, v. 1, n. 4, p. 267-286, Nov 1 2012. DOI: 10.1515 / plm2012-0032.

FERRARESI, C. et al Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 4, p. 1259-67, May 2015a. DOI: 10.1007/s10103-015-1723-8.

FERRARESI, C. et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. **Photochem Photobiol**, v. 91, n. 2, p. 411-6, Mar-Apr 2015b. DOI: 10.1111/php.12397.

FERRARESI, C. et al. Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. **J Biophotonics**, v. 8, n. 9, p. 740-54, Sep 2015c. DOI: 10.1002/jbio.201400087.

FERRARESI, C. et al. Effects of Light-Emitting Diode Therapy on Muscle Hypertrophy, Gene Expression, Performance, Damage, and Delayed-Onset Muscle Soreness: Case-control Study with a Pair of Identical Twins. *Am J Phys Med Rehabil*, v. 95, n. 10, p. 746-57, Oct 2016. DOI: 10.1097/PHM0000000000000490.

FUKUOKA, C. Y. et al. Low-power laser irradiation in salivary glands reduces glycemia in streptozotocin-induced diabetic female rats. **J Biophotonics**, v. 9, n. 11-12, p. 1246-1254, Dec 2016. DOI: 10.1002/jbio.201600175.

GÓRALCZYK, K. et al. Low-level laser irradiation modifies the effect of hyperglycemia on adhesion molecule levels. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 7, p. 1521-1526, 2018. DOI: 10.1007/s10103-018-2511-z.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337, 2017. DOI: 10.3934/biophy.2017.3.337.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochemistry and photobiology**, v. 94, n. 2, p. 199-212, 2018. DOI: 10.1111/php.12864.

HUANG, F. et al. Palmitic Acid Induces MicroRNA-221 Expression to Decrease Glucose Uptake in HepG2 Cells via the PI3K/AKT/GLUT4 Pathway. **Biomed Res Int**, v. 2019, p. 8171989, 2019. DOI: 10.1155 / 2019/8171989.

HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, n. 4, p. 358-83, 2009. DOI: 10.2203/dose-response.09-027.Hamblin.

HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose Response**, v. 9, n. 4, p. 602-18, 2011. DOI: 10.2203/dose-response.11009.Hamblin.

IBUKI, F. K. et al. Laser irradiation affects enzymatic antioxidant system of streptozotocin-induced diabetic rats. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 3, p. 911-918, 2013. DOI 10.1007/s10103-012-1173-5.

IVY, J. L. Muscle Glycogen Synthesis Before and After Exercise. **Sports Medicine**, v. 11, n. 1, p. 6-19, January 01 1991.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 49, n. 1, p. 1-17, Mar 1999. DOI: 10.1016 / S1011-1344 (98) 00219-X.

KARU, T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2010. DOI: 10.1089=pho.2010.2789.

KOUHKHEIL, R. et al. Impact of Photobiomodulation and Condition Medium on Mast Cell Counts, Degranulation, and Wound Strength in Infected Skin Wound Healing of Diabetic Rats. **Photobiomodulation, photomedicine, and laser surgery**, v. 37, n. 11, p. 706-714, 2019. DOI: 10.1089 / photob.2019.4691.

LEAL, E. C. P. et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise-induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. **journal of orthopaedic & sports physical therapy**, v. 40, n. 8, p. 524-532, 2010. DOI: 10.2519 / jospt.2010.3294.

LIANG, J.; LIU, L.; XING, D. Photobiomodulation by low-power laser irradiation attenuates A β -induced cell apoptosis through the Akt/GSK3 β / β -catenin pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 7, p. 1459-1467, 2012. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.003.

MARTIGNAGO, C. C. S. et al. Effects of red and near-infrared LED light therapy on full-thickness skin graft in rats. **Lasers Med Sci**, Jun 5 2019. DOI: 10.1007 / s10103019-02812-6.

MASON, E. F.; RATHMELL, J. C. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 4, p. 645-54, Apr 2011. DOI: 10.1016 / j.bbamcr.2010.08.011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, 7ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

NICOLAU, J. et al. Altered glycogen metabolism in the submandibular and parotid salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes. **J Oral Sci**, v. 47, n. 2, p. 111-6, Jun 2005. DOI: 10.2334 / josnugd.47.111.

OLIVEIRA, F. C. et al. 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. *Complementary therapies in medicine*, v. 42, p. 178-183, 2019. DOI: 10.1016/j.ctim.2018.11.015.

OLIVEIRA, V. R. S. ; SANTOS-EICHLER, R. A.; DALE, C. S. Photobiomodulation increases cell viability via AKT activation in an in vitro model of diabetes induced by glucose neurotoxicity. *Lasers Med Sci*, Jun 20 2019. DOI: 10.1007/s10103-019-028082.

PATROCINIO, T. et al. Effect of low-level laser therapy (808 nm) in skeletal muscle after resistance exercise training in rats. **Photomed Laser Surg** , v. 31, n. 10, p. 492-8, Oct 2013. DOI: 10.1089/pho.2013.3540.

PEPLOW, P. V.; BAXTER, G. D. Testing infrared laser phototherapy (810 nm) to ameliorate diabetes: irradiation on body parts of diabetic mice. **Lasers in surgery and medicine**, v. 45, n. 4, p. 240-245, 2013. DOI: 10.1089/pho.2014.3745.

PERSEGHIN, G. et al. Increased Glucose Transport–Phosphorylation and Muscle Glycogen Synthesis after Exercise Training in Insulin-Resistant Subjects. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 18, p. 1357-1362, 1996. DOI: 10.1056 / NEJM199610313351804.

POSTAL, B.G. Caracterização dos efeitos e de vias de sinalização de compostos presentes em *Ilex paraguariensis* St. Hil. envolvidas na homeostase da glicose. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

ROJAS, J. C.; GONZALEZ-LIMA, F. Neurological and psychological applications of transcranial lasers and LEDs. **Biochemical pharmacology** [S.l.], v. 86, n. 4, p. 447-457, 2013. DOI:10.1016/j.bcp.2013.06.01.

SANTOS, L. S. et al . PBMT and topical diclofenac as single and combined treatment on skeletal muscle injury in diabetic rats: effects on biochemical and functional aspects. *Lasers in medical science*, v. 34, n. 2, p. 255-262, 2019. DOI: 10.1007/s10103-0182580-z.

SHARMA, S. K. et al. Dose response effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 8, p. 851-859, 2011. DOI 10.1002/lsm.21100.

SILVA, G. et al. Infrared photobiomodulation (PBM) therapy improves glucose metabolism and intracellular insulin pathway in adipose tissue of high-fat fed mice. **Lasers in medical science** [S.l.], v. 33, n. 3, p. 559-571, 2018 DOI: 10.1007/s10103-0172408-2.

TATMATSU-ROCHA, J. C. et al. Light-emitting diode modulates carbohydrate metabolism by pancreatic duct regeneration. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 8, p. 1747-1755, 2017. DOI: 10.1007/s10103-017-2245-3.

TUNÉR, J.; JENKINS, P. A. Parameter reproducibility in photobiomodulation. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2016. DOI: 10.1089/pho.2016.4105.

VIEIRA, W. H. et al. Photobiomodulation increases mitochondrial citrate synthase activity in rats submitted to aerobic training. *Lasers in medical science*, v. 33, n. 4, p. 803-810, 2018 DOI: 10.1007/s10103-017-2424-2.

YOSHIMURA, T. M.; SABINO, C. P.; RIBEIRO, M. S. Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice. **J Biophotonics** , Sep 16 2016. DOI: 10.1002/jbio.201600088.