

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**CAMILLA GARCIA DE OLIVEIRA**

**Efeito da fotobiomodulação na miosite: avaliação da nocicepção,  
inflamação e regeneração muscular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**São Paulo  
2022**

**CAMILLA GARCIA DE OLIVEIRA**

**Efeito da fotobiomodulação na miosite: avaliação da nocicepção,  
inflamação e regeneração muscular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: Biologia Morfofuncional

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marucia Chacur.

Versão Corrigida.

**São Paulo**

**2022**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Garcia de Oliveira, Camilla  
Efeito da fotobiomodulação na miosite: avaliação  
da nocicepção, inflamação e regeneração muscular /  
Camilla Garcia de Oliveira; orientadora Marucia  
Chacur. -- São Paulo, 2022.  
104 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. dor muscular. 2. miosite. 3. fotobiomodulação.  
4. células satélites. 5. macrófagos. I. Chacur,  
Marucia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato (a): Camilla Garcia de Oliveira

Título da Dissertação: EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA MIOSITE:  
AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO, INFLAMAÇÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Marucia Chacur

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de  
Doutorado, em sessão pública realizada em ...../...../....., considerou o(a)  
candidato(a):

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da Fotobiomodulação na miosite: avaliação da regeneração muscular e o envolvimento das células da glia", protocolada sob o CEUA nº 7373190319, sob a responsabilidade de **Marucia Chacur e equipe; Camilla Garcia de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 28/04/2019.

We certify that the proposal "Effect of Photobiomodulation on myositis: assessment of muscle regeneration and glial cell involvement", utilizing 144 Heterogenics rats (144 males), protocol number CEUA 7373190319, under the responsibility of **Marucia Chacur and team; Camilla Garcia de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 04/28/2019.

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

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Anatomia**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **200 a 220 g**

Linhagem: **Norvegicus/Wistar**

**N amostral: 144**

São Paulo, 29 de abril de 2019



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

## DEDICATÓRIA

*Ao meu querido avô Antônio Rossato Filho  
 e a minha amada avó Valdomira Batista de Oliveira.*

*Obrigada por toda força e carinho emanados a mim  
 aonde quer que vocês estejam!*

*Amo vocês *

*Da neta que os ama!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e sempre em primeiro lugar, agradeço a Deus e Nossa Senhora pela minha vida, pela missão concedida a mim, pela oportunidade de evoluir todos os dias, por estar nesse plano com as pessoas que estão comigo e por TUDO, exatamente TUDO. Aprendi e insisto cada vez mais em ter fé em Ti meu Pai, eu confio nos Teus planos para mim. Eu sei que Ele nunca me deixou, sempre estarei segura em Teus braços.

Aos meus queridos Maria José (Zezé) e Dalton, vocês são minhas maiores inspirações de vida, na matéria e no espírito, muito obrigada pelo grande discernimento ao cuidar de nós com grandes orientações e por compartilharem a vida comigo, vocês são meus maiores exemplos! Obrigada a minha família espiritual que são outros presentes na minha vida, além da Zezé e do Dalton. Tânex (Tânia) Lu (Luciane), Íris, Bela, Keinana (Karina), João, Doce (Andreza), Dirceu, Dona Marilene, Carol e às crianças que enchem minha vida de alegria, Pic Winky (Maria Clara), Pedroca (Pedro), Gorduchete (Heloísa), Bebê Teco-Teco (Bernardo) e Brigadeirinho da Dindinha (Isaac). Sou muito feliz de ter reencontrado vocês, contem comigo para toda a vida e além da vida.

À vrida da minha vrida, você é um dos maiores presentes de Deus e Nossa Senhora na minha vida. Miguel, tudo desde o início foi especial e necessário para nós, desde a primeira vez que eu te vi (em aula) até onde chegamos, na nossa casa, construindo nossa família e sei que tudo isso é só o começo. Obrigada pelo amor, paciência, pela segurança que você me traz, por todo carinho, apoio, principalmente nos momentos não tão fáceis, por compartilhar a vida comigo, por nunca ter desistido do que vivemos hoje e me ensinar a ser cada vez mais leve. Eu te amo daqui até o infinito vri vri vri!

À Maggiezinha, obrigada por estar comigo quando nem eu me aguentava, você foi muito importante nesse processo, cuidarei de você para sempre ou o contrário rs!

Aos meus irmãos, Raul e Ygor, vocês são e sempre serão importantes para mim. Muito obrigada por todo processo que passamos juntos, foram importantes para que me tornasse quem eu sou hoje. De onde quer que eu esteja, pedirei a Deus e Nossa Senhora para que cuide, proteja e guarde vocês! Amo vocês infinitamente.

Ao meu Tio Rô e minha Vó Temis, obrigada por tanto me incentivarem, por comemorar cada conquista e vitória minha. Sou feliz em tê-los em minha vida! Serei eternamente grata a Deus por vocês.

À minha mãe Regina, obrigada por todo amor e carinho investidos em mim, você sempre foi a maior incentivadora e admiradora da Camilla. Me ensinou a lutar pelo que eu queria com muita garra, independentemente de qualquer coisa. Me ensinou que o céu é o limite e eu sou muito grata por ter você em minha vida. Obrigada por toda a estrutura que eu precisava para começar e continuar a trilhar meus caminhos. Serei eternamente agradecida a você por tudo e a Deus por ter você como minha mãe. Eu te amo, mãe!

Aos meus sogros, Rosa e Maurício, aos meus cunhados Ana Carolina, Gabriel, Alexandre e Letícia e a minha sobrinha Manuzinha, amor da vida dos titios dela! Obrigada por todo o carinho.

Comecei essa jornada pela indicação de uma pessoa muito querida para mim, o Fábio. Fáb foi meu professor, acreditou em mim e no meu trabalho. Obrigada Fáb, serei sempre grata a você!

À minha querida orientadora Marucia pela oportunidade em 2016 que se estendeu por esses 6 anos com muita teimosia, esforço e trabalho. Maru, muito obrigada por tudo que você me ensinou e compartilhou nesse tempo que estivemos juntas. Obrigada por tanto carinho e bondade comigo e com todos, principalmente nos momentos mais críticos na minha vida pessoal, você foi muito importante ao entender o meu momento e não me deixar desistir. Te admiro e sei que você pode chegar muito além do que você imagina. Você me ensinou a importância de voar novos voos, e por isso, voarei.

A rotina de laboratório foi compartilhada com colegas muito especiais para mim. Dani, você é um cara excepcional, exemplo de pesquisador, muito obrigada pelos ensinamentos e pausas no seu trabalho para me ensinar tudo o que sei sobre *blotting*. Mi, que saudades 22k, você foi uma incentivadora gigantesca para que eu continuasse com esse projeto, muito obrigada pelas discussões de paper que me fizeram ir além do que eu pensei chegar. Igor, obrigada pelas longas companhias e descontrações no laboratório. Lívia, Dani boy e Nath, vocês foram os melhores IC's que eu pude conhecer na vida, além de serem pessoas que tem um cantinho especial em meu coração. Alyne, obrigada por estar comigo no início e me ensinar muito do que na prática eu sei hoje. Joyce, o pouco tempo que estivemos juntas eu pude ter um dos maiores exemplos de pesquisadora comigo, jamais me esquecerei de você. Karina, você é brilhante, obrigada pelas conversas e companhia. Will, sem palavras para você e para o seu trabalho, obrigada por compartilhar comigo as melhores partes do que é



ser um pesquisador de excelência e pela colaboração nas extensas e longas análises das lâminas de H&E, nosso trabalho ficou lindo. Obrigada a todos os alunos que passaram pelo L.A.N.D e puderam me ensinar ou me permitiram ensinar também!

O Departamento de Anatomia e a Pós-graduação me permitiu conhecer pessoas especiais que se estendeu para além da pesquisa. Bibi (Bianca), obrigada pelo carinho, apoio e pela amizade, sou feliz em tê-la por perto! Aririririri (Ariela), que prazer é ter te conhecido e ter compartilhado com você tantos momentos, muito obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Neurobiologia Celular, ao Professor Luiz Roberto Giorgetti de Britto por nos conceder livre acesso para o que precisássemos dentro do laboratório. E claro, agradecer ao Didi (Adilson) pela grande descontração e alegria, sempre foi um prazer ir fotografar minhas lâminas sabendo que com certeza eu teria boas risadas.

Às colaborações durante todo o trabalho. Obrigada Professora Renata Giorgi do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan pelo auxílio com as primeiras análises de H&E, a empresa Bright Photomedicine pelo aparelho LEDT e Professor Rildo Aparecido Volpini do Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelas lindas marcações de macrófagos na análise de IHQ.

Aos membros da minha da minha Banca de Qualificação, Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup> Elen Haruka Miyabara, Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup> Alice Cristina Rodrigues e Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup> Elaine Minatel, obrigada pelo olhar crítico que me ajudaram a direcionar de uma melhor forma essa Dissertação.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da secretaria do Departamento de Anatomia do ICB, muito obrigada pelo auxílio sempre que eu precisei, em especial a Patricia Rocha, desde meu ingresso no Programa de Pós-graduação Biologia de Sistemas até a finalização dessa etapa ela foi muito solícita nas minhas dúvidas (e olha que não foram poucas) e no que eu precisei, agradeço de coração pelo seu trabalho. Às técnicas Marta e Sônia pelo auxílio prestado no multiusuário sempre que necessário.

Ao Departamento de Anatomia, ao Instituto de Ciências Biomédicas e a Universidade de São Paulo por me permitirem viver esse sonho e desenvolver esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (CAPES- Código de Financiamento 001; FAPESP processo 2017/18039-1).

Por fim, agradeço a todos que puderam contribuir com o desenvolvimento desse trabalho, direta ou indiretamente, muito muito muito obrigada!

## EPÍGRAFE

*“Ver na vida algum motivo pra sonhar  
Ter um sonho todo azul  
Azul da cor do mar”.*  
*Tim Maia, 1970.*

## RESUMO

OLIVEIRA, C.G. **Efeito da fotobiomodulação na miosite: avaliação da nocicepção, inflamação e regeneração muscular.** 2022. 104p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A lesão muscular ocorre com frequência em diferentes situações, como no esporte, por exemplo, podendo levar a dor e comprometimento da função muscular, desencadeando limitação funcional e impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos. Diferentes terapias complementares são estudadas a fim de melhorar a qualidade de vida de pacientes acometidos por lesões musculares, como a fotobiomodulação (PBMT, abreviação do inglês “*photobiomodulation therapy*”), que têm demonstrado eficácia na melhora do quadro algico, na redução da inflamação, na regeneração e cicatrização de tecidos a partir de duas modalidades principais: o laser de baixa a média intensidade (LLLT) e do diodo emissor de luz (LEDT). Os fótons gerados por esses dispositivos são absorvidos pelo citocromo c oxidase (CCO), que aumentam a atividade enzimática, consumo de oxigênio e produção de trifosfato de adenosina (ATP). No entanto, existem poucos estudos demonstrando se a PBMT pode auxiliar na recuperação da miosite. Sendo assim, o objetivo principal deste estudo é investigar se PBMT pode modular a nocicepção, inflamação e regeneração muscular em um modelo experimental de miosite. Foram utilizados dispositivos de laser (LLLT; 660 nm) e LED (LEDT; 850 nm), com energia total de 3 J para ambos. Durante 5 sessões, as aplicações foram realizadas sobre o músculo gastrocnêmio de ratos Wistar submetidos ao modelo de miosite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA). O efeito da PBMT na resposta nociceptiva foi avaliado antes, durante e após a finalização do tratamento, assim como na resposta edematogênica. Ao final do tratamento, foram analisados o infiltrado inflamatório, a incidência de macrófagos e a análise da expressão de proteínas relacionadas a regeneração muscular [proteína de caixa emparelhada 7 (Pax7), fator de crescimento de fibroblastos 6 (FGF-6), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1), fator regulador miogênico 4 (MRF4) e cadeia pesada de miosina embrionária (MyHC-e)]. A PBMT diminuiu parcialmente a hipernocicepção e o edema, além de controle da inflamação, porém sem efeitos significativos na regeneração muscular.

**Palavras-chave:** Dor muscular; Miosite; Fotobiomodulação; Células satélites; Macrófagos.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, C.G. **Effect of photobiomodulation on myositis: assessment of nociception, inflammation and muscle regeneration.** 2022. 104p. Dissertation (Master thesis in Life Systems Biology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2022.

Muscle injury often occurs in different situations, such as in sports, and can lead to pain and impairment of muscle function, triggering functional limitation and a negative impact on the quality of life of individuals. Different complementary therapies are studied in order to improve the quality of life of patients affected by muscle injuries, such as photobiomodulation (PBMT), which has been shown to be effective in improving pain, reducing inflammation, tissue regeneration and healing from two main modalities: low-level laser (LLLT) and light emitting diode (LEDT). Photons generated by these devices are absorbed by cytochrome c oxidase (CCO), which increase enzyme activity, oxygen consumption, and adenosine triphosphate (ATP) production. However, there are few studies demonstrating whether PBMT can interfere with myositis recovery. Therefore, the main objective of this study is to investigate whether PBMT can modulate nociception, inflammation, and muscle regeneration in an experimental model of myositis. Laser devices (LLLT; 660 nm) and LED (LEDT; 850 nm) were used, with a total energy of 3 J for both. During 5 sessions, applications were performed on the gastrocnemius muscle of Wistar rats submitted to the Complete Freund's Adjuvant (CFA) induced myositis model. The effect of PBMT on the nociceptive response was evaluated before, during and after the end of treatment, as well as on the edematogenic response. After the end of the treatment, we analyzed the inflammatory infiltrate, the incidence of macrophages and the expression of proteins related to muscle regeneration [paired box protein 7 (Pax7), fibroblast growth factor 6 (FGF-6), transforming growth beta 1 (TGF- $\beta$ 1), myogenic regulatory factor 4 (MRF4) and embryonic myosin heavy chain (MyHC-e)]. PBMT partially decreased hypernociception and edema, in addition to controlling inflammation, but without significant effects on muscle regeneration.

**Keywords:** Muscle pain; Myositis; Photobiomodulation; Satellites cells; Macrophages.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Ilustração do processo inflamatório e regenerativo no músculo esquelético.....	21
<b>Figura 2</b> – Ilustração dos fótons provenientes do LLLT e LEDT.....	23
<b>Figura 3</b> – Desenho experimental.....	27
<b>Figura 4</b> – Ilustração dos pontos de aplicação da PBMT (LLLT ou LEDT).....	30
<b>Figura 5</b> – Imagem da aplicação do teste de alodinia tátil por meio dos filamentos de von Frey.....	31
<b>Figura 6</b> – Imagem da aplicação do teste para avaliação da hiperalgesia mecânica por meio de um analgesímetro digital (von Frey eletrônico).....	32
<b>Figura 7</b> – Imagem da aplicação do teste de hiperalgesia térmica (Hargreaves plantar test).....	33
<b>Figura 8</b> – Imagem da mensuração do músculo gastrocnêmio com o paquímetro.....	34
<b>Figura 9</b> – Análise comportamental da alodinia tátil dos animais com miosite e tratados com LLLT ou LEDT (teste de von Frey filamentos).....	41
<b>Figura 10</b> – Análise comportamental da hiperalgesia mecânica (teste de von Frey eletrônico) dos animais com miosite e tratados com LLLT ou LEDT.....	43
<b>Figura 11</b> – Análise comportamental da hiperalgesia térmica (teste de Hargreaves) dos animais com miosite e tratados com LLLT ou LEDT.....	45
<b>Figura 12</b> – Gráfico de barras representando a porcentagem (%) do edema muscular no músculo GC.....	46
<b>Figura 13</b> – Fotomicrografias representativas do músculo GC.....	50
<b>Figura 14</b> – Gráficos de barras representativos das quantificações da área de infiltrados inflamatórios, número de células com núcleo centralizado e área das fibras musculares com núcleo centralizado.....	52
<b>Figura 15</b> – Incidência de macrófagos no músculo GC com base na marcação de fenótipos tipo M1 e M2.....	54

<b>Figura 16</b> – Gráfico de barras da quantificação da incidência de macrófagos (células/mm <sup>2</sup> ) com base na marcação de fenótipos tipo M1 e M2 no músculo GC.....	55
<b>Figura 17</b> – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína Pax7 no músculo GC direito (ipsilateral).....	57
<b>Figura 18</b> – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína Pax7 no músculo GC esquerdo (contralateral).....	58
<b>Figura 19</b> – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína FGF-6 no músculo GC direito (ipsilateral).....	59
<b>Figura 20</b> – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína TGF-β1 no músculo GC direito (ipsilateral).....	60
<b>Figura 21</b> – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína MRF4 no músculo GC direito (ipsilateral).....	61
<b>Figura 22</b> – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína MRF4 no músculo GC esquerdo (contralateral).....	62
<b>Figura 23</b> – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína MyHC-e no músculo GC direito (ipsilateral).....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros utilizados para o tratamento com PBMT (LLLT e LEDT).....	29
<b>Tabela 2</b> – Anticorpos primários e secundários utilizados para análise proteica por WB.....	38



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADAMTS1</b>	metaloproteinase com motivo de trombospondina tipo 1
<b>AINEs</b>	anti-inflamatórios não esteroides
<b>AMPc</b>	monofosfato cíclico de adenosina
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>BDA</b>	Biotério do Departamento de Anatomia
<b>CCO</b>	citocromo c oxidase
<b>CD206</b>	<i>cluster of differentiation 206</i>
<b>CD68</b>	<i>cluster of differentiation 68</i>
<b>CDME</b>	corno dorsal da medula espinal
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CFA</b>	Adjuvante completo de Freund
<b>CIA</b>	artrite induzida por colágeno
<b>CK2</b>	caseína quinase 2
<b>CW</b>	<i>continuous wave</i>
<b>DAB</b>	<i>diaminobutyric acid</i>
<b>DTM</b>	disfunção temporomandibular
<b>DTT</b>	<i>dithiothreitol</i>
<b>E.P.M</b>	erro padrão da média
<b>EAE</b>	encefalomielite autoimune experimental
<b>EAM</b>	miocardite autoimune experimental
<b>EAT</b>	tireoidite autoimune experimental
<b>EAU</b>	uveíte autoimune experimental
<b>EDL</b>	extensor longo dos dedos
<b>EDTA</b>	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>ELA</b>	esclerose lateral amiotrófica
<b>EROs</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>et al.</b>	e outros
<b>FGF</b>	fator de crescimento de fibroblastos ( <i>fibroblast growth factor</i> )
<b>FGF-6</b>	fator de crescimento de fibroblastos 6
<b>FGFR1</b>	receptor do fator de crescimento de fibroblastos 1 ( <i>fibroblast growth factor receptor 1</i> )

<b>FGFR2</b>	receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2 ( <i>fibroblast growth factor receptor 2</i> )
<b>FGFR3</b>	receptor do fator de crescimento de fibroblastos 3 ( <i>fibroblast growth factor receptor 3</i> )
<b>FGFR4</b>	receptor do fator de crescimento de fibroblastos 4 ( <i>fibroblast growth factor receptor 4</i> )
<b>FGFs</b>	fatores de crescimento de fibroblastos
<b>GaAs</b>	arsenieto de gálio
<b>GAPDH</b>	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ( <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> )
<b>GC</b>	gastrocnêmio
<b>GCs</b>	gastrocnêmios
<b>H&amp;E</b>	hematoxilina-eosina
<b>HEPES</b>	<i>zwitterionic sulfonic acid buffering agent</i>
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i>
<b>i.m</b>	intramuscular
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biomédicas
<b>IGF-1</b>	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
<b>IHQ</b>	imuno-histoquímica
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleucina- 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleucina- 6
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>LCA</b>	ligamento cruzado anterior
<b>LED</b>	diodo de emissor de luz
<b>LEDT</b>	tratamento de diodo de emissor de luz
<b>LLLT</b>	tratamento de laser de baixa a média intensidade
<b>M1</b>	macrófago fenótipo 1 (pró-inflamatório)
<b>M2</b>	macrófago fenótipo 2 (anti-inflamatório)
<b>MEC</b>	matriz extracelular
<b>MF</b>	medida final
<b>MgCl<sup>2+</sup></b>	cloreto de magnésio
<b>MHC I</b>	cadeia pesada de miosina classe I

<b>MI</b>	medida inicial
<b>miR</b>	microrna
<b>MRF4</b>	fator regulatório miogênico 4 ( <i>myogenic regulatory factor 4</i> )
<b>MRFs</b>	fatores reguladores miogênicos ( <i>myogenic regulatory factor</i> )
<b>MYF3</b>	
<b>Myf5</b>	fator miogênico 5 ( <i>myogenic factor 5</i> )
<b>Myh3</b>	miosina-3 (embrionária)
<b>Myh8</b>	miosina-8 (neontal)
<b>MyHC</b>	cadeia pesada de miosina ( <i>myosin heavy chain</i> )
<b>MyHC-e</b>	cadeia pesada de miosina embrionária ( <i>embryonic myosin heavy chain</i> )
<b>MyHC-n</b>	cadeia pesada de miosina embrionária ( <i>neonatal myosin heavy chain</i> )
<b>MyoD</b>	proteína para determinação de mioblastos ( <i>myoblast determination protein</i> )
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NGF</b>	fator de crescimento nervoso
<b>NIR</b>	infravermelho próximo ( <i>near-infrared</i> )
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>OCT</b>	<i>tissue-tek optimal cutting temperature</i>
<b>Pax3</b>	proteína de caixa emparelhada 3 ( <i>paired box transcription factor 3</i> )
<b>Pax7</b>	proteína de caixa emparelhada 7 ( <i>paired box transcription factor 7</i> )
<b>PBMT</b>	terapia de fotobiomodulação ( <i>photobiomodulation therapy</i> )
<b>PBS</b>	tampão fosfato-salino ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PDGF</b>	fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PMSF</b>	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
<b>RNAs</b>	ácidos ribonucleicos
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate solution</i>
<b>SNC</b>	sistema Nervoso Central
<b>TBST</b>	<i>tris-buffered saline tween</i>
<b>TGF</b>	fator de crescimento transformador

<b>TGF-β1</b>	fator de crescimento transformador beta 1
<b>TNF-α</b>	fator de necrose tumoral
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>vs</b>	versus
<b>WB</b>	<i>western blotting</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b><math>\alpha</math></b>	alfa
<b><math>\beta</math></b>	beta
<b>cm<sup>2</sup></b>	centímetro quadrado
<b>g</b>	grama
<b>°C</b>	grau celsius
<b>J</b>	Joule
<b>±</b>	mais ou menos
<b>m</b>	metro
<b>m/s</b>	Metro por segundo
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro
<b>µm</b>	micrometro
<b>µm<sup>2</sup></b>	Micrometro quadrado
<b>µM</b>	micromol
<b>mA</b>	miliampère
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>mW</b>	miliwatt
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>n</b>	número
<b>%</b>	porcentagem
<b>kDa</b>	quilodalton
<b>s</b>	segundos
<b>V</b>	volt

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	Dor e Nocicepção: conceitos gerais .....	13
1.2	Dor muscular .....	15
1.3	Inflamação e regeneração muscular .....	16
1.4	Fotobiomodulação (PBMT).....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1	Objetivo Geral .....	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1	Animais.....	26
3.2	Grupos experimentais e delineamento do estudo .....	26
3.3	Procedimentos .....	27
3.3.1	Indução da miosite .....	27
3.3.2	Tratamento com fotobiomodulação (PBMT) .....	28
3.3.3	Mensuração do músculo gastrocnêmio (GC) .....	33
3.3.4	Avaliação da sensibilidade nociceptiva .....	30
3.3.5	Eutanásia e dissecação dos músculos gastrocnêmios (GC) .....	33
3.3.6	Ensaio histológico .....	34
3.3.7	Ensaio de Imuno-histoquímica (IHQ).....	36
3.3.8	Ensaio de <i>Western Blotting</i> (WB) .....	36
3.3.9	Análise estatística.....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	Eficácia da indução da miosite com CFA e o efeito da PBMT (LLLT e LEDT) sobre a alodinia tátil .....	39
4.2	Desenvolvimento de hiperalgesia mecânica após injeção de CFA e o efeito da PBMT (LLLT e LEDT) sobre este parâmetro .....	42

4.3	Desenvolvimento de hiperalgesia térmica após injeção de CFA e o efeito da PBMT sobre este parâmetro .....	44
4.2	Desenvolvimento do edema muscular a partir da injeção de CFA e o efeito da PBMT (LLLT e LEDT) sobre a resposta edematogênica no músculo GC	46
4.3	Ensaio histológico .....	46
4.4	Ensaio de Imuno-histoquímica para marcação da incidência de macrófagos.....	53
4.5	Ensaio de Western Blotting (WB) no músculo gastrocnêmio.....	56
4.5.1	Quantificação da expressão proteica de Pax7 após a injeção de CFA e o tratamento com LLLT e LEDT.....	56
4.5.2	Quantificação da expressão proteica do fator de crescimento de fibroblastos 6 (FGF-6) após o tratamento com LLLT e LEDT .....	59
4.5.3	Quantificação da expressão proteica do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) após a injeção de CFA e o tratamento com LLLT e LEDT .....	59
4.5.4	Quantificação da expressão proteica do fator regulador miogênico 4 (MRF4) após a injeção de CFA e o tratamento com LLLT e LEDT .....	60
4.5.5	Quantificação proteica da cadeia pesada de miosina embrionária (MyHC-e) após a injeção de CFA e o tratamento com LLLT e LEDT .....	63
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>ATIVIDADES ACADÊMICAS .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor e Nocicepção: conceitos gerais

A dor é descrita pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” [1]. Esta é uma experiência pessoal, que pode ser influenciada em cada indivíduo por fatores biológicos, psicológicos e sociais, que é entendida pelas experiências vividas, sendo que seu relato merece ser respeitado. A incapacidade de comunicação não invalida a possibilidade de um ser humano ou um animal sentir dor, pois a descrição verbal é apenas um dos vários comportamentos para expressar a dor [1].

A dor inclui componentes discriminativos da sensibilidade dolorosa, envolvendo aspectos afetivos e motivacionais. Os componentes do tipo sensorial-discriminativo compreendem a detecção da intensidade, localização, duração, padrão temporal e qualidade do estímulo nocivo. Por outro lado, os componentes do tipo emocional-afetivo-cognitivo referem-se a reação emocional decorrente da percepção, isto significa, a integração do estímulo nocivo com áreas corticais e sistema límbico [2]. Ainda, pode ser classificada de acordo com o tipo de lesão, como neurogênica, quando ocorre lesão do tecido neuronal; neuropática, quando ocorre a disfunção de um nervo; psicogênica, quando ocorre por fatores psicológicos; nociceptiva, quando ocorre por estimulação excessiva dos nociceptores [3].

Um termo mais recente, dor nociplástica, é caracterizada como “dor que surge de uma nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara, ou ameaça, de lesão tecidual real provocando a ativação de nociceptores periféricos, ou evidência de doença ou lesão no sistema somatossensorial que cause a dor [1, 4]. Em termos de duração, um episódio de dor pode ser agudo ou crônico. A dor aguda corresponde à ativação local de nociceptores induzida por um dano tecidual e desaparece até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado [5]. Já a dor crônica é provocada por uma lesão tecidual ou doença e geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, sendo um importante fator de incapacidade e sofrimento [6, 7].

O processo doloroso é entendido e interpretado como tal pelo mecanismo de nocicepção, fenômeno pelo qual ocorre a codificação e o processamento dos estímulos



ambientais físicos e químicos ou patológicos, por meio de uma cascata complexa de eventos da periferia até as estruturas superiores do Sistema Nervoso Central (SNC). O primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o SNC [2, 8].

Essa transformação é chamada de transdução e ocorre através dos nociceptores localizados em tecidos superficiais, profundos e vísceras, que se apresentam como terminações nervosas livres [9]. Os nociceptores, então, são sensibilizados pela ação de substâncias químicas, denominadas algio gênicas, presentes no ambiente tissular, como por exemplo, acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íons potássio, prostaglandinas, tromboxano, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento nervoso (NGF), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), dentre outros [10, 11].

Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A-delta e C e, quando ativados, sofrem alterações no potencial de repouso de sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação [9, 12]. As fibras A-delta, mielinizadas, de condução rápida (5 a 30m/s), são responsáveis por estímulos térmicos e mecânicos e estão relacionadas à dor aguda cortante e bem localizada. Fibras do tipo C são amielinizadas, de condução lenta (0,5 a 2m/s), responsáveis por estímulos térmicos, mecânicos e químicos e são relacionadas à dor crônica indistinta e mal localizada. As fibras A-delta, em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor [2, 12].

Após a etapa de transdução ocorre a transmissão do sinal, onde o estímulo é conduzido a estruturas do SNC, inicialmente no corno dorsal da medula espinal (CDME). A próxima fase da nocicepção é a chamada modulação [2, 9, 13], na qual o estímulo é modulado no CDME antes de chegar à níveis superiores do SNC. Na última etapa da nocicepção, chamada de percepção, o estímulo é então integrado no SNC, sendo percebido e interpretado como dor [2, 9, 13].

Além disso, a estimulação persistente de nociceptores provoca dor espontânea, redução do limiar de sensibilidade, hiperalgesia e alodinia. A IASP definiu os termos

“hiperalgesia” para a situação em que um estímulo normalmente doloroso provoca uma resposta exacerbada, e “alodinia”, quando um estímulo normalmente inócuo resulta em dor [14]. Dessa forma, podemos classificar a hiperalgesia como primária e secundária. A hiperalgesia primária é conceituada como sendo o aumento da resposta ao estímulo doloroso no local da lesão, enquanto a hiperalgesia secundária é aquela que se estende para áreas adjacentes [15].

## **1.2 Dor muscular**

De acordo com a revisão de literatura realizada por Abdelhamid & Sluka (2015) cerca de 20% da população adulta sofre de dor musculoesquelética crônica, uma condição debilitante que é reconhecida mundialmente como a segunda principal causa de incapacidade na população mundial, e uma das principais causas de morbidade e ausência do trabalho motivada por doença [16].

As afecções musculoesqueléticas podem surgir de lesão traumática, não traumática ou em condições patológicas que afetam qualquer parte do sistema músculo esquelético, como os músculos, ossos ou articulações. São exemplos de dor musculoesquelética aquela decorrente da osteoartrite, da artrite inflamatória e de doenças do tecido conjuntivo, incluindo músculos, articulações e ossos [17]. Ainda, na dor musculoesquelética, existe um subgrupo denominado dor muscular que é descrita como latejante e constante e pode ser referida para outras estruturas somáticas mais profundas, tais como tendões, fáscia, articulações ou outros músculos. É de difícil localização e é causada pela estimulação dos nociceptores musculares [18, 19].

A dor muscular crônica representa alto custo econômico, e não responde bem às intervenções convencionais, como por exemplo anti-inflamatório não-esteroides (AINEs), o que afeta a qualidade de vida das pessoas. Apesar de sua prevalência, os mecanismos fisiopatológicos desses distúrbios são mal compreendidos [20]. Em estudo realizado por Teixeira *et al.* (2001), dos 485 pacientes com dor de difícil controle, 278 dos casos (57,3%) estavam relacionados com afecções do aparelho locomotor [21]. Em pesquisa realizada com 1.954 entrevistados, 63% relatam ter tido dores musculares, entre eles 57% sentem dor pelo menos uma vez por semana. Ainda, as principais causas apontadas para as dores musculares são má postura (58%) e excesso de

exercício (56%). Na sequência, os motivos citados são gripes ou resfriados e excesso de trabalho ou estudo, com 48% e 42%, respectivamente [22].

Além disso, a dor muscular pode ser causada por lesão muscular, que ocorre com frequência nos esportes, como contusões ou entorses [23, 24], em quedas, distensão muscular, fibromialgia [25], uso de estatina para redução de colesterol [26] e no trabalho, incluindo a população de jovens, adultos e idosos [27]. Esse tipo de lesão causa dor e comprometimento da função muscular, desencadeando importante limitação funcional [28].

Para mimetizar a dor muscular, dispomos de modelos murinos de dor muscular como a criolesão, induzida pelo congelamento do músculo [27, 29]; queda de carga diretamente sobre o músculo [30]; injeção de carragenina [31]; e a injeção de CFA (Adjuvante Completo de *Freund*) [32-35].

O CFA emulsionado com um antígeno é um método amplamente utilizado para induzir doença autoimune em modelos animais, ainda que a contribuição do CFA para a resposta imune não seja bem compreendida [36]. É composto de uma emulsão de água em óleo, preparado a partir de óleos não metabolizáveis (óleo de parafina e monooleato de manida) e contém a *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch) morto [37]. Exemplos de modelos de doenças induzidas em roedores pela injeção de CFA incluem artrite induzida por colágeno (CIA) pela emulsão de CFA e colágeno tipo II, miocardite autoimune experimental (EAM), tireoidite autoimune experimental (EAT), encefalomielite autoimune experimental (EAE) e uveíte autoimune experimental (EAU) [36]. Ainda, o CFA foi utilizado para indução de dor plantar aguda e crônica [38], dor inflamatória [39], e comumente utilizado para induzir artrite reumatoide [38-41].

### **1.3 Inflamação e regeneração muscular**

O músculo esquelético adulto é um tecido pós-mitótico, terminalmente diferenciado, que possui um imenso potencial de regeneração após lesão [42, 43] mas, para isso, o tecido muscular esquelético requer uma resposta celular coordenada, que envolve a ativação de vários processos celulares e moleculares, podendo ser dividido em três fases: a fase inflamatória, a fase de ativação/diferenciação das células satélites e a fase de maturação, quando ocorre a remodelação das novas fibras musculares formadas [44, 45], incluindo a infiltração de macrófagos pró (perfil M1, ativação

alternativa) e anti-inflamatórios (perfil M2; ativação alternativa), ademais, com a ativação de células satélites (Figura 1) [46, 47].

Após a lesão, a resposta celular mais imediata à lesão muscular (fase 1 de regeneração) é a resposta inflamatória, desencadeada pela necrose de fibras musculares, incluindo o recrutamento de células das linhagens mielóide e linfóide (células imunológicas) circulantes, acompanhado por um aumento do influxo de cálcio e liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático da fibra muscular lesionada, levando à proteólise do tecido danificado. As primeiras células a infiltrarem no tecido lesado, são os neutrófilos, o que ocorre nas primeiras 6 horas após o dano muscular [45, 48-51].

Posteriormente, os macrófagos infiltram o músculo danificado. A população de macrófagos consiste em duas populações distintas, os macrófagos iniciais pró-inflamatórios e os macrófagos M2, anti-inflamatórios. Os macrófagos do tipo M1, após o recrutamento dos neutrófilos, infiltram no meio lesado, atingem seu pico em torno de 24 horas após a lesão e são responsáveis pela fagocitose de partes do tecido danificado. Ainda, o perfil de macrófago M1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como desintegrina e metaloproteinase com motivo de trombospondina tipo 1 (ADAMTS1), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), e TNF- $\alpha$  para estimular a proliferação de células satélites musculares, ao mesmo tempo que as limitam para diferenciação e fusão [44, 52, 53].

Uma fração de macrófagos com perfil M1 são modificados de um fenótipo pró-inflamatório para um fenótipo anti-inflamatório, denominados macrófagos com perfil M2, aproximadamente 2 dias após lesão muscular, com pico 4-6 dias após a lesão. Os macrófagos M2, por sua vez, liberam moléculas anti-inflamatórias e fatores de crescimento que impedem a proliferação de células satélites e estimulam sua diferenciação, fusão e crescimento de miofibras. À medida que as células satélites evoluem da proliferação para a diferenciação, o número de macrófagos M1 diminui enquanto a população intracelular de macrófagos M2 aumenta no tecido danificado. Se essa transição for retardada e o fenótipo M1 for prolongado, as citocinas inflamatórias persistem e a miogênese é prejudicada, demonstrando a importância dessa troca fenotípica precisamente temporizada [53, 54].

A segunda fase da regeneração do músculo esquelético é caracterizada pela ativação e diferenciação das células satélites, um processo altamente orquestrado concomitante com alterações morfológicas. As células satélites, as células-tronco do músculo esquelético, são indispensáveis para a regeneração muscular. Sua funcionalidade é modulada criticamente por vias de sinalização intrínsecas, bem como por interações com o nicho de células-tronco [44, 55, 56].

Em condições de repouso, as células satélites se mantêm quiescentes e residem sob a lâmina basal da fibra muscular. Neste estado de quiescência, as células satélites expressam o fator de transcrição "*paired box transcription factor 7*" (Pax7), sendo, neste caso, fosforilado pela caseína quinase 2 (CK2) [57, 58]. O fator de transcrição Pax7 é expresso em todas as células satélites e é necessário para sua manutenção pós-natal e regeneração do músculo esquelético, quando preciso. Ao serem ativadas, as células satélites musculares expandem-se e se diferenciam durante a regeneração do músculo esquelético, um processo controlado pela expressão sequencial de fatores de transcrição, semelhante ao programa de diferenciação da miogênese embrionária [52, 59, 60].

As células satélites possuem um enorme potencial miogênico, que depende principalmente da expressão dos genes Pax, como Pax3 em fase embrionária e Pax7 em fase adulta, e subsequente expressão de fatores reguladores miogênicos (MRFs), sendo eles MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4 [42, 44, 61]. Após a ativação, as células satélites co-expressam Pax7, MyoD (um marcador precoce para comprometimento miogênico) e Myf5, deixando o estado quiescente e se diferenciando em mioblastos, antes de amadurecer para miofibras. Notavelmente, um subconjunto de células satélites ativadas desregula MyoD e resiste ao processo de diferenciação, mantendo assim um estado mitoticamente inativo semelhante à quiescência, para garantir o pool de células satélites.

Ainda na fase de proliferação, as células satélites (agora denominadas mioblastos), expressam MyoD e miogenina, migram e diferenciam-se em miócitos, ainda expressando MyoD e miogenina. Os miócitos são fundidos em miotubos, os quais apresentam aumento da expressão de miogenina e MRF4, o que leva à regulação negativa da expressão de Pax7, que é inativado pela clivagem da caspase 3 [57]. O processo de diferenciação ocorre com o auxílio de fatores de crescimento, como fator

de crescimento de fibroblastos (FGF), do fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento humano (HGF), fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), NGF, entre outros [62].

Alguns FGFs são encontrados no músculo esquelético, que controlam vários aspectos da organogênese, como proliferação de células-tronco musculares, migração de células precursoras miogênicas, diferenciação de miotubos e regeneração de músculos danificados [63]. Os FGFs medeiam suas respostas biológicas ligando-se aos receptores do fator de crescimento de fibroblastos 1 (FGFR1), 2 (FGFR2), 3 (FGFR3) e 4 (FGFR4) de superfície celular [64].

Um dos FGF importantes restritos ao músculo esquelético em desenvolvimento e em fase adulta é o fator de crescimento de fibroblastos 6 (FGF-6) [65]. O FGF-6 desempenha um papel duplo na regeneração muscular, podendo estimular tanto a proliferação e migração de mioblastos pela ligação ao FGFR1 quanto promover a diferenciação muscular, ligando-se ao FGFR4 [66-68].

Morfologicamente, as células progenitoras miogênicas tornam-se miócitos alongados, que então se fundem para formar miotubos multinucleados [42, 54, 69]. As fibras musculares recém-formadas são caracterizadas por núcleos localizados centralmente e pela reexpressão de cadeias pesadas de miosina embrionária (MyHC-e) e neonatal (MyHC-n), que podem ser usados para identificar fibras em regeneração [70], as quais serão posteriormente substituídas pelas isoformas adultas de MyHC [71]. Esse processo é seguido pela maturação em miofibras (fase 3 de regeneração), que são as unidades contráteis do músculo esquelético [44].

Além disso, a reparação efetiva do músculo esquelético depende de interações complexas entre fibroblastos, miofibroblastos, células miogênicas e citocinas, como fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1) [72]. O TGF- $\beta$ 1 desempenha importante papel na função do fibroblasto e manutenção da matriz extracelular (MEC) [73], no entanto, quando suprarregulado, TGF- $\beta$ 1 pode inibir a diferenciação terminal de mioblastos [74, 75].

Além da regeneração muscular se tornar incompleta pela suprarregulação de TGF- $\beta$ 1 [76], este é considerado um fator pró-fibrótico no tecido muscular em resposta a lesão, inflamação ou doença [77]. A formação de tecido cicatricial (fibrose) no músculo

esquelético reduz a recuperação da força [78] e declínio da função muscular em diferentes doenças relacionadas ao músculo esquelético [79].

Atualmente, fármacos analgésicos e AINEs são vastamente prescritos para tratar a dor associada a distúrbios musculoesqueléticos. No entanto, esses medicamentos tratam apenas os sintomas e não a causa da doença. Eles têm sido associados a uma gama de efeitos colaterais relacionados ao uso a longo prazo [80].

Estratégias terapêuticas complementares que sejam eficazes em melhorar a regeneração/reparação do músculo após a lesão estão relacionadas com a regulação da inflamação, o aumento do processo de regeneração e o bloqueio do excesso de fibrose [81], como é o caso da terapia de fotobiomodulação (PBMT, do inglês "*photobiomodulation therapy*"), isto pois, os tratamentos disponíveis podem apresentar efeitos colaterais, resistência ao paciente, altas doses sem efeito desejado, problemas renais e hepáticos.

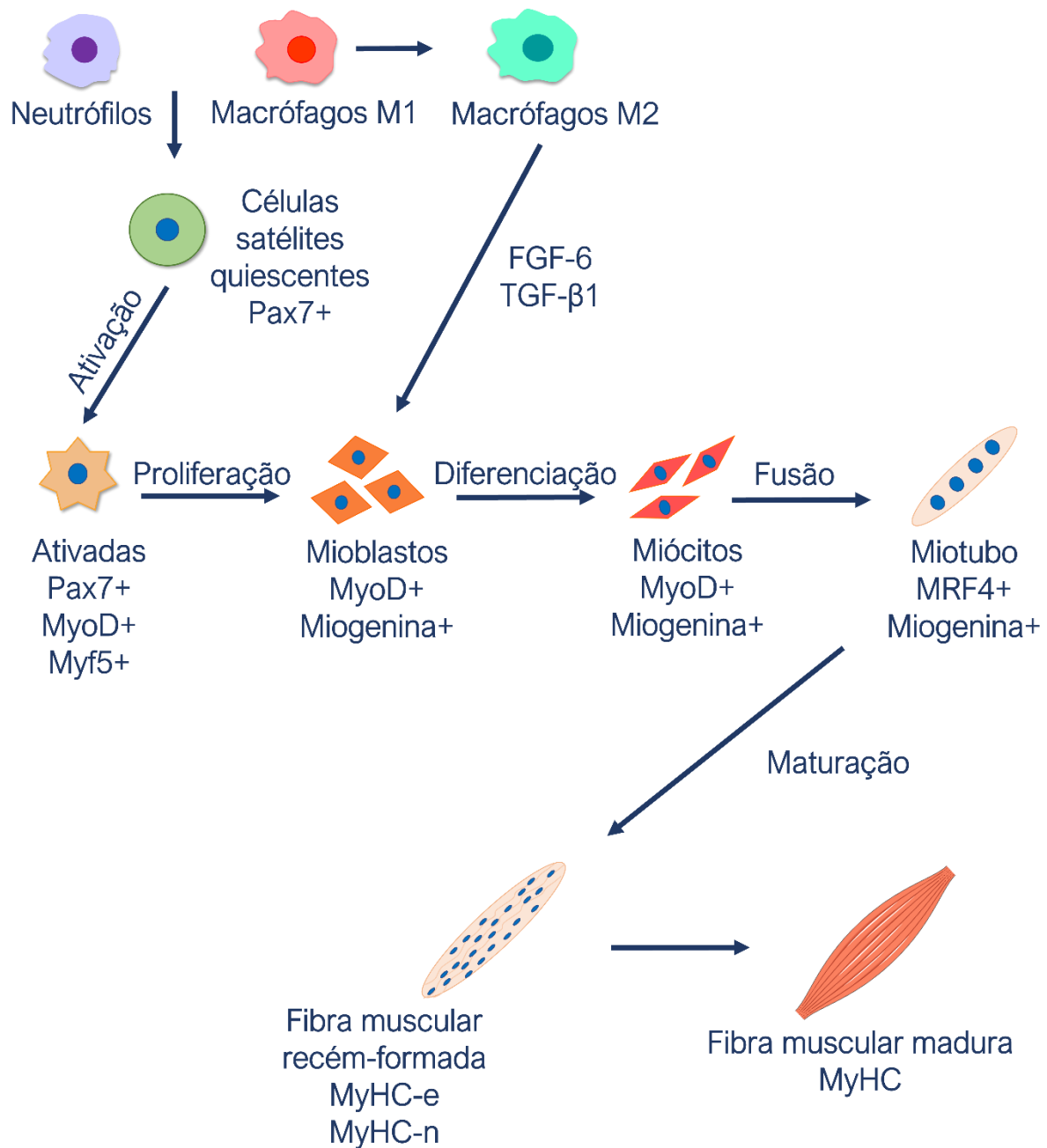


Figura 1 – Ilustração do processo inflamatório e regenerativo no músculo esquelético. Fonte: Camila Garcia de Oliveira (2022).

#### 1.4 Fotobiomodulação (PBMT)

A PBMT consiste em uma forma não invasiva de tratamento e utiliza comprimentos de onda de luz variando do vermelho (600–700 nm) ao infravermelho próximo (NIR) (700–950 nm), para fornecer baixa irradiância (potência da luz por unidade de área) ao tecido alvo [82-86].



Esse tipo de tratamento têm sido um método complementar para o controle da dor [84], reduzir a inflamação, modulando vários aspectos do processo inflamatório, incluindo edema, formação hemorrágica, necrose, influxo de neutrófilos e a atividade de macrófagos e linfócitos [80], ainda promove a regeneração dos vasos linfáticos, melhora a motilidade linfática e previne fibrose tecidual [82].

Esses efeitos são o resultado de reações primárias envolvendo a absorção de comprimentos de onda específicos da luz por componentes da cadeia respiratória mitocondrial [82, 87, 88]. Os cromóforos primários foram identificados como citocromo c oxidase nas mitocôndrias e nos canais iônicos de cálcio [89].

Os efeitos secundários da absorção de fótons incluem aumentos na produção de adenosina trifosfato (ATP), aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento na concentração de óxido nítrico (NO) e a modulação dos níveis de cálcio [87, 88, 90, 91]. Os efeitos terciários incluem a ativação de inúmeros fatores de transcrição, levando a uma melhor sobrevivência celular, aumento da proliferação, migração e síntese proteica [87, 88, 90, 91].

A justificativa para a aplicação da PBMT nos músculos baseia-se justamente na estimulação da atividade mitocondrial. Os músculos dependem fortemente de ATP, que é a fonte biológica de energia necessária para o trabalho muscular e, portanto, níveis robustos de ATP é a hipótese mais popular para explicar os efeitos biomodulatórios que a PBMT parece exercer sobre o tecido muscular [92]. Além disso, existem vários outros mecanismos de ação para explicar os efeitos da PBMT no tecido muscular, como a estimulação das defesas contra o estresse oxidativo, prevenção e reparação de danos musculares, modulação da expressão gênica por ativação de fatores de transcrição e possível aumento na excitabilidade das fibras musculares [92].

A PBMT possui uma propriedade física importante para o efeito terapêutico, que é a monocromaticidade, isto é, os fótons que os compõe são da mesma cor e com mesmo comprimento de onda. Esta terapia é comumente aplicada por meio de dois tipos de fonte luminosa, sendo uma do tipo coerente e unidirecional, fótons provenientes viajando ordenadamente em relação ao tempo e em uma mesma direção, produzida a partir de um dispositivo laser de baixa a média intensidade (LLLT), e outra não coerente e não unidirecional, produzida por diodos emissores de luz ([LED]; [Figura 2]), sendo que ambas as modalidades podem melhorar a cicatrização de feridas

e tecidos moles, reduzir a inflamação e aliviar a dor aguda e crônica [93]. Com a vantagem de não ser invasiva, as aplicações da PBMT são amplas, desde o alívio da dor até a promoção da recuperação de tendinopatias, lesões nervosas, osteoartrite e cicatrização de feridas [94].

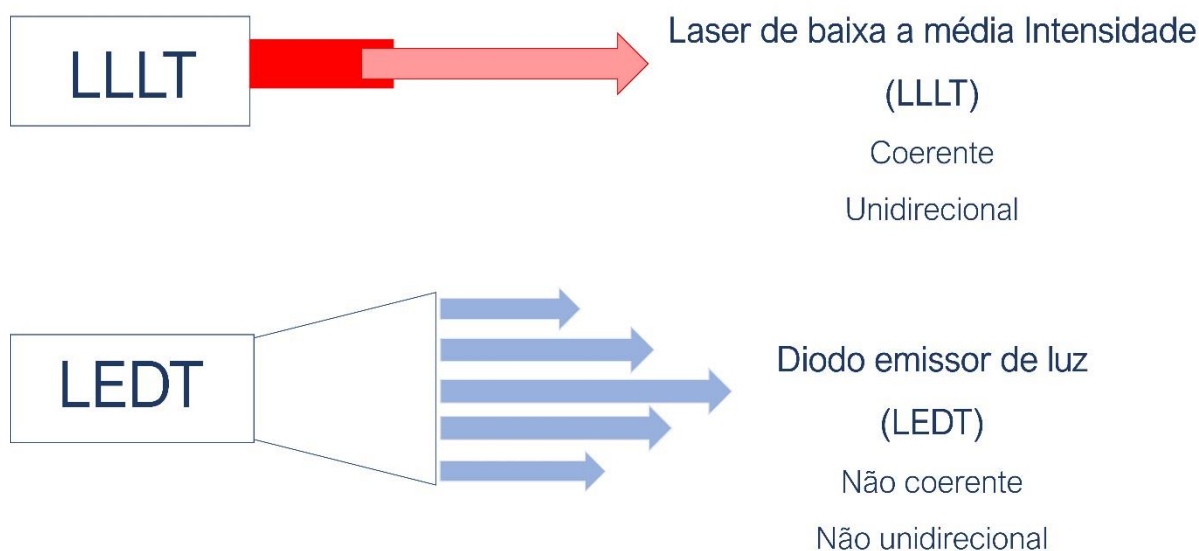


Figura 2 – Ilustração dos fótons provenientes do LLLT e LEDT. Fonte: Camila Garcia de Oliveira (2022).

Nos últimos anos, diferentes estudos demonstraram o efeito do LLLT como, por exemplo, em modelo de neuropatia [83, 95], dor musculoesquelética [96], dor lombar crônica inespecífica [97] e dor miofascial em mulheres [98]. Ainda, demonstrou capacidade em acelerar o processo de regeneração muscular [99], melhorar a neuralgia trigeminal [100, 101] e a dor neuropática diabética [102, 103].

A respeito da aplicação do LEDT podemos destacar o uso nos cuidados de saúde como tratamento de doenças neurológicas [104], dor inespecífica no joelho [80], redução das alterações patológicas locais induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops asper* [105], tratamento de fascite plantar [106] e para recuperação muscular após exercício excêntrico prejudicial [107].

Alguns parâmetros dosimétricos são destacados como importantes para o uso da PBMT, tais como comprimento de onda ( $\lambda$ ), a potência da fonte (mW), a densidade de energia ( $J/cm^2$ ), a densidade de potência ( $mW/cm^2$ ), o tempo de irradiação (s), a energia total aplicada (J) e o período de tratamento (número de sessões), como descrito por

Hamblin (2019) [108]. Os parâmetros descritos apresentam diferentes combinações, as quais podem ser usadas para ambas as modalidades de aplicação da luz (LLLT ou LEDT) [109].

Devido à grande importância dos parâmetros citados acima, já que estes determinam a eficácia e sucesso do tratamento e devido à grande discrepância nas diferentes literaturas publicadas na última década, se faz necessário a padronização da dosimetria para tratamento de dor muscular e o modelo de miosite, em específico, com PBMT.

Conforme descrito anteriormente e frente à complexidade do processo de regeneração do músculo esquelético, ainda existe uma grande lacuna do que diz respeito ao local e tempo de aplicação da terapia. Apesar da PBMT ser muito utilizada no meio clínico, ainda falta embasamento científico que demonstrem sua eficácia. Com base em nossa pesquisa, particularmente, faltam estudos demonstrando se as células e os fatores envolvidos no processo da regeneração muscular podem ser modulados pela PBMT, como células satélites, macrófagos, Pax7, FGF-6, TGF- $\beta$ 1, MRF4 e MyHC-e, e, que contribuem para acelerar o processo anti-inflamatório e induzir o processo regenerativo no músculo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito terapêutico da fotobiomodulação (PBMT) sobre o quadro nociceptivo, inflamatório e regenerativo do músculo gastrocnêmico de ratos submetidos à miosite por meio da injeção de CFA.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a)** Avaliar o efeito do tratamento com PBMT utilizando LLLT e LEDT após indução de miosite no músculo gastrocnêmio, durante 5 sessões;
- b)** Comparar o efeito do LLLT ao LEDT após indução de miosite no músculo gastrocnêmio;
- c)** Avaliar as respostas nociceptivas tátil, mecânica e térmica no modelo experimental de miosite induzida por CFA e o efeito da PBMT sobre tais respostas;
- d)** Realizar a medida da espessura muscular por meio de paquimetria, para analisar o efeito da PBMT sobre o edema muscular causado pela injeção de CFA;
- e)** Analisar a morfologia das fibras musculares com relação a área de infiltrado inflamatório, número e área de fibras com núcleos centralizados no músculo GC ao término do protocolo experimental;
- f)** Analisar a incidência de macrófagos no músculo GC ao término do protocolo experimental;
- g)** Analisar a expressão proteica de Pax7, FGF6, TGF- $\beta$ 1, MRF4 e MyHC-e no músculo GC ao término do protocolo experimental.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 29 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos jovens (6 a 8 semanas), machos, pesando entre 200 e 220 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) e mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia (BDA), ambos da Universidade de São Paulo (USP). Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP, sob o nº 7373190319. Para a realização dos experimentos comportamentais foi utilizada a sala de comportamento do BDA, a qual possui isolamento e temperatura controlada ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), local em que os animais foram mantidos por um período de 45 minutos para adaptação e posteriormente submetidos aos experimentos comportamentais. Todos os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção [110]. As diretrizes ARRIVE 2.0 também foram consideradas durante a elaboração e a execução do trabalho [111].

#### 3.2 Grupos experimentais e delineamento do estudo

Os animais foram divididos aleatoriamente (randomização simples) em 4 grupos experimentais: *Naïve* (n = 4-6), animais que não receberam injeção de CFA ou veículo, tampouco tratamento com PBMT; Veículo (n = 4), animais que receberam injeção da combinação de óleo mineral (veículo do CFA) e solução salina (NaCl 0,9 %), no músculo GC e foram utilizados como controle do veículo de diluição do CFA; CFA (n = 4-10), animais que receberam injeção de CFA no músculo GC e permaneceram sem tratamento; CFA+LLLT (n = 4), animais que receberam injeção de CFA no músculo GC e foram tratados com LLLT; CFA+LEDT (n = 3-4), animais que receberam injeção de CFA no músculo GC e foram tratados com LEDT.

Para analisar o efeito antinociceptivo/analgésico da PBMT (LLLT e LEDT), os testes comportamentais (alodinia tátil, hiperalgesia mecânica e hiperalgesia térmica) foram aplicados antes de qualquer procedimento (medida inicial, MI; dia zero) e repetidos no 6º, 7º, 8º, 9º, 10º e 11º (medida final - MF) dias após a injeção de CFA. Quanto a mensuração do músculo, esta foi realizada antes de qualquer procedimento

(MI) e ao término do protocolo experimental (MF). Após esse período, os animais foram eutanasiados e os tecidos foram coletados para posterior análise. Os testes comportamentais foram aplicados às patas traseiras, mais especificamente, nos membros posteriores direito (ipsilateral à injeção de CFA) e esquerdo (contralateral à injeção de CFA). A Figura 3, abaixo, ilustra a linha dos procedimentos realizados neste estudo:

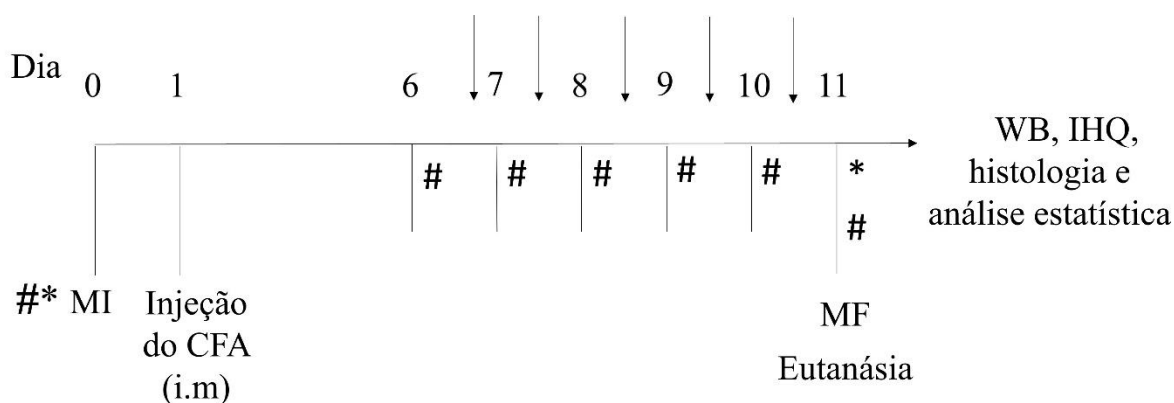


Figura 3 – Desenho experimental. MI: medida inicial; CFA: Adjuvante Completo de Freund; i.m.: intramuscular; PBMT: fotobiomodulação (LLLT ou LEDT); MF: medida final; WB: *Western blotting*; IHQ: imuno-histoquímica. Símbolo (#) indica os dias em que foram realizados testes comportamentais; (\*) indica mensuração do músculo gastrocnêmio; (↓) representa os dias de tratamento com PBMT (LLLT ou LEDT).

### 3.3 Procedimentos

#### 3.3.1 Indução da miosite

A miosite foi induzida no músculo gastrocnêmio (GC) do membro posterior direito dos ratos, pela injeção de CFA (Sigma-Aldrich, Saint. Louis, Missouri, EUA), composto de uma emulsão de água em óleo, preparado a partir de óleos não metabolizáveis (óleo de parafina e monooleato de manida) e que contém a *Mycobacterium tuberculosis* morta [37], na dose total de 150µg/300µL. Como controle, utilizamos o veículo do CFA (combinação de óleo mineral e solução salina, NaCl 0,9 %; 1:1). O volume da injeção de CFA foi de 300 µL por GC, consistindo em uma aplicação no ventre medial e outra no ventre lateral do músculo GC, sendo 150 µL cada aplicação [33-35].

### **3.3.2 Tratamento com fotobiomodulação (PBMT)**

Para aplicação da PBMT foram utilizados dois tipos de dispositivos: um dispositivo laser de baixa a média intensidade (LLLT), da marca IBRAMED® (Amparo- SP, Brasil), e um diodo emissor de luz (LEDT), da marca Bright Photomedicine (São Paulo- SP, Brasil). Os parâmetros de aplicação estão descritos na Tabela 1 e foram escolhidos com base em estudos prévios de nosso laboratório [35, 100, 102, 112] e também a partir das recomendações de Hamblin (2019), que estabelece os parâmetros que devem ser obrigatoriamente reportados em estudos experimentais e clínicos que envolvam a aplicação de PBMT [108].

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para o tratamento com PBMT (LLLT e LEDT).

<b>Informações do dispositivo</b>	<b>LLLT</b>	<b>LEDT</b>
<b>Fabricante</b>	IBRAMED	Bright Photomedicine
<b>Modelo</b>	LASERPULSE Diamond	Light-Aid
<b>Ano de fabricação</b>	2010	2017
<b>Tipo de emissor</b>	AlGaInP	GaAs
<b>Número de emissores</b>	Um Laser	25 LED
<b>Comprimento de onda e largura de banda (nm)</b>	660 nm	850 nm
<b>Modo de pulso (CW ou Hz, duty cycle)</b>	Onda contínua (CW-continuous wave)	Onda contínua (CW-continuous wave)
<b>Tamanho do ponto do feixe no alvo (cm<sup>2</sup>)</b>	0.06310 cm <sup>2</sup>	10 cm <sup>2</sup>
<b>Irradiância no alvo (mW/cm<sup>2</sup>) e ponto</b>	30 mW/ponto	18.3 mW/ponto
<b>Duração da exposição (s)</b>	17 segundos	2 minutos e 44 segundos
<b>Exposição radiante (J/cm<sup>2</sup>)</b>	8.08 J/cm <sup>2</sup>	0.3 J/cm <sup>2</sup>
<b>Energia radiante (J)</b>	3 J	3 J
<b>Número de pontos irradiado</b>	6 pontos	1 ponto
<b>Técnica de aplicação</b>	Contato com a pele	Contato com a pele
<b>Número e frequência de sessões de tratamento</b>	5 sessões, realizadas em dias consecutivos	5 sessões, realizadas em dias consecutivos
<b>Energia radiante total em todo o curso de tratamento [J]</b>	15 J	15 J

Para a aplicação do LLLT, os animais foram imobilizados em uma superfície plana e o laser probe foi posicionado diretamente na região do músculo GC direito (membro inferior direito), sobre o qual foram realizados 6 pontos ao longo do músculo, sendo 3 pontos na porção medial e 3 na porção lateral. Para a aplicação do LEDT, o dispositivo foi posicionado sobre todo o músculo GC, devido à sua ampla área de cobertura, sendo



realizada uma única aplicação, conforme demonstrado na Figura 4. Tanto para o LLLT quanto para o LEDT, foi utilizada a energia total (radiante; J) de 3 J.

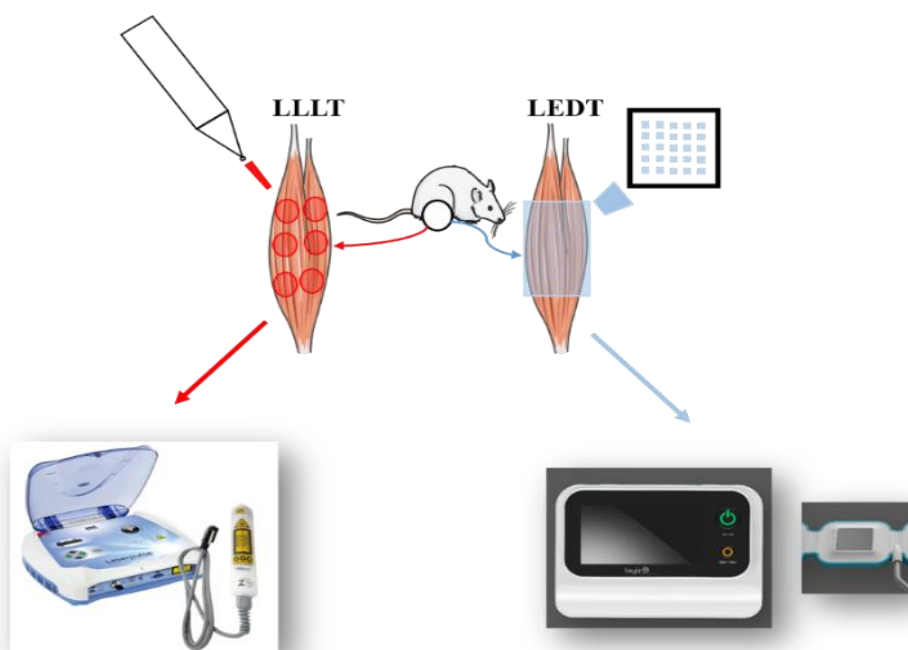


Figura 4 – Ilustração dos pontos de aplicação da PBMT (LLLT ou LEDT). À esquerda, a aplicação do tratamento com o aparelho de LLLT (seta vermelha) sobre os seis pontos definidos no músculo GC (círculos vermelhos); à direita, aplicação de LEDT (seta azul), abrangendo toda área central do ventre muscular (retângulo azul). Fonte: Camila Garcia de Oliveira (2022).

### 3.3.3 Avaliação da sensibilidade nociceptiva

Para a realização dos testes comportamentais (alodinia tátil, 3.3.4.1; hiperalgesia mecânica, 3.3.4.2; hiperalgesia térmica, 3.3.4.3) todos os ratos foram inicialmente habituados à sala de experimentação e aos equipamentos em que foram realizados os testes, por aproximadamente 45 minutos, em dois dias alternados que se antecedem aos experimentos. Todos os resultados dos testes comportamentais foram avaliados por meio de comparações das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

#### 3.3.3.1 Alodinia tátil (von Frey filamentos)

A alodinia tátil foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta ao estímulo tátil aplicado à pata posterior dos ratos, lado direito (ipsilateral) e lado esquerdo (contralateral), segundo método descrito por Chaplan *et al.* (1994) [113], modificado (Figura 5). Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em caixas de acrílico posicionadas sobre uma base de malha metálica fixada na parede, com dimensões de

1 metro (m) de comprimento por 45 centímetros (cm) de largura. A trama metálica de 1 cm<sup>2</sup> permite com que o experimentador acessasse as patas dos animais.

Aos valores obtidos, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey (Anesthesiometer Semmes-Weinstein, Stoelting Co., EUA). Os filamentos usados e seus respectivos valores em gramas (g) foram: 3,61 (0,407 g); 3,84 (0,692 g); 4,08 (1,202 g); 4,17 (1,479 g); 4,31 (2,041 g); 4,56 (3,630 g); 4,74 (5,495 g); 4,93 (8,511 g.); 5,07(11,749 g) e 5,18 (15,136 g). O filamento capaz de induzir a retirada da pata por duas vezes consecutivas foi considerado como a força em grama (g) necessária para induzir a resposta nociceptiva do animal (100 % de resposta).



Figura 5 – Imagem da aplicação do teste de alodinia tátil por meio dos filamentos de von Frey.

### 3.3.3.2 Hiperalgisia mecânica (von Frey eletrônico)

Para determinação da hiperalgisia mecânica foi utilizado o teste de von Frey eletrônico, utilizando-se de um analgesímetro digital (Insight<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP, Brasil), segundo método descrito por Guerrero *et al.* (2006) [114], modificado (Figura 6). O analgesímetro é composto de um transdutor de pressão, onde encontra-se acoplada uma ponteira universal, do próprio equipamento, e é ligado por um cabo a um detector digital de força. A ponteira do transdutor foi pressionada contra a superfície da pele dos membros posteriores direito (ipsilateral à injeção de CFA ou veículo) e esquerdo (contralateral à injeção de CFA ou veículo) dos animais, compreendendo a

região medial do ventre muscular do músculo GC. A pressão aplicada é expressa em grama (g) e representa a força necessária para gerar um reflexo de retirada do membro.



Figura 6 – Imagem da aplicação do teste para avaliação da hiperalgesia mecânica por meio de um analgesímetro digital (von Frey eletrônico).

### 3.3.3.3 Hiperalgesia térmica (Hargreaves)

A determinação da hiperalgesia térmica foi feita por meio do teste plantar descrito por Hargreaves *et al.* (1988) [115]. Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico e posicionados sobre uma plataforma de vidro, que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor (Figura 7). Uma fonte de luz infravermelha acoplada a um monitor digital foi colocada sob o vidro, sendo posicionada e acionada manualmente sob as regiões plantares direita e esquerda do animal. Quando a fonte de luz é acionada, um cronômetro digital é deflagrado no monitor acoplado à fonte luminosa, até que o animal retire a pata, quando, então, a fonte de luz cessa e o cronômetro para automaticamente. Neste teste, o limiar nociceptivo térmico é representado pelo tempo, em segundos, necessário para a retirada da pata do animal.

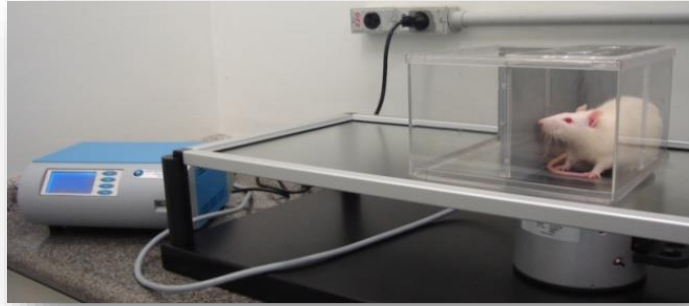


Figura 7 – Imagem da aplicação do teste de hiperalgesia térmica (Hargreaves *plantar test*).

### 3.3.1 Mensuração do músculo gastrocnêmio (GC)

Para determinação da progressão do edema muscular no modelo de miosite induzida por CFA foi utilizado um paquímetro metálico, conforme demonstrado na figura a seguir (Figura 8). Este instrumento foi posicionado no membro inferior do animal, posteriormente ao terço médio do ventre do músculo GC, em sentido látero-medial [116]. As mensurações do músculo GC foram realizadas tanto do lado experimental (membro inferior direito) quanto do lado contralateral (membro inferior esquerdo). A paquimetria foi realizada antes de qualquer procedimento (MI) e ao término do protocolo experimental (MF), para todos os grupos. As medidas dos músculos (MI e MF) foram obtidas em milímetros (mm) e a partir destas foi calculado o delta ( $\Delta$ ) entre a MI e a MF de cada animal (MF-MI); este delta foi convertido em porcentagem (%), sendo estabelecidos os animais do grupo CFA como 100%.



Figura 8 – Imagem da mensuração do músculo gastrocnêmio com o paquímetro.

### **3.3.2 Eutanásia e dissecação dos músculos gastrocnêmios (GC)**

Após a realização dos testes anteriormente descritos, os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de decapitação (utilizando-se uma guilhotina), após breve anestesia inalatória com Isoflurano a 3% (Cristália<sup>®</sup>, Itapira, SP, Brasil). Em seguida, os músculos GC (direito e esquerdo) foram dissecados e coletados para os ensaios histológicos, ensaios de imuno-histoquímica e de *Western blotting*, descritos a seguir.

### **3.3.3 Ensaios histológicos**

O músculo GC foi dissecado no sentido caudo-rostral e os fragmentos de interesse (ventres lateral e medial) foram previamente crioprotetidos em banhos de solução de sacarose a 5 %, 10 % e 20 % (1 hora cada), conforme protocolo modificado de Paixão (2011) [117]. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em Tissue-Tek<sup>®</sup> *Optimal Cutting Temperature* (OCT) (Sakura<sup>®</sup> Finetek, CA, Estados Unidos) com Tragacanth (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) (aproximadamente 200 µg) e foram submetidos a um rápido congelamento em isopentano (2-metil-butano) (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brazil), por aproximadamente 15 segundos, previamente refrigerado por imersão em nitrogênio líquido, com a finalidade de impedir o rompimento das fibras musculares e para que estas se mantivessem preservadas durante o processamento do tecido [118].

Após a inclusão dos tecidos, estes permaneceram em freezer a -80 °C até a realização da etapa subsequente.

Os tecidos foram cortados em uma espessura de 10 µm em um criostato de congelamento (Leica Biosystems, Alemanha) e os cortes foram submetidos à coloração por hematoxilina-eosina (H&E), constando de: lavagem em água deionizada (2 minutos); coloração de hematoxilina (3 minutos); lavagem com água corrente (5 minutos); coloração com eosina (1 minuto e 30 segundos); desidratação com álcool absoluto I (2 minutos); desidratação com álcool absoluto II (2 minutos); fixação com xilol I (2 minutos); fixação com xilol II (2 minutos); e, finalmente, fixação com xilol III (2 minutos). Em seguida, as lâminas foram preservadas com Permount® (Fisher Scientific International, Hampton, EUA) e cobertas com lamínulas. Para o ensaio histológico foi utilizado um corte do músculo GC de cada um dos animais dos grupos experimentais. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Nikon E1000 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera fotográfica digital Nikon DCM 1200 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão). Para a quantificação de áreas de infiltrados inflamatórios (µm<sup>2</sup>), número e área de fibras com núcleos centralizados, foram obtidas imagens com ampliação de 40X e 100X. As quantificações foram realizadas com auxílio do software *Image J* (NIH, MD, EUA), utilizando-se da ferramenta “*color threshold*”, a qual permite selecionar as cores predominantes do infiltrado inflamatório e que podem ser traduzidas em *pixels*. As áreas de infiltrado inflamatório foram consideradas aquelas com incidência de coloração azul-púrpura em estruturas basofílicas (conferida pela hematoxilina), por serem ricas em cromatina, ribossomos e regiões citoplasmáticas ricas em ácidos ribonucleicos (RNAs) [119]. Já a quantificação da área total das fibras musculares foi realizada por meio da rotina “*polygon selections > analyze > measure > area*” para seleção visual de áreas eosinofílicas. Para tais medidas, as imagens foram previamente calibradas com auxílio da ferramenta “*set scale*” a partir da barra de calibração de 20 µm. Uma vez identificados os *pixels* de interesse, foi utilizada a ferramenta “*analyze particles*” [120]. Vale ressaltar que as análises do número e área de fibras com núcleos centralizados foram realizadas às cegas.

### **3.3.4 Ensaios de Imuno-histoquímica (IHQ)**

Os cortes de tecido muscular foram processados conforme descrito anteriormente no item 3.3.6 e mantidos em freezer a -80 °C até serem utilizados para análise de IHQ. Para o ensaio de imuno-histoquímica foi utilizado um corte do músculo GC de cada um dos animais dos grupos experimentais. Os cortes foram lavados em acetona a -20 °C por 10 minutos, e posteriormente lavados em solução PBS por 2 vezes de 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-CD68 (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido), diluição de 1:8000, para avaliação da incidência de macrófagos de fenótipo M1 e M2; anticorpo anti-CD206 (receptor de manose) (Abcam, Cambridge, MA, EUA), diluição de 1:10000, para avaliação da subpopulação de macrófagos M2. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários por um período de 18 horas à temperatura de 4 °C (*overnight*). O produto dessa reação foi detectado pelo complexo EnVision System-HRP (DAB) de acordo com as instruções do fabricante (Dako North America, Carpinteria, CA, EUA) e a contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primário e secundário em solução de PBS contendo albumina bovina a 1 %.

Os cortes foram examinados sob microscopia de luz e as avaliações das imunorreações para as diferentes populações de macrófagos (M1 e M2) foram feitas pelas proporções de volume de áreas positivas no tecido muscular, determinadas pelo limite de cor [121]. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Nikon E1000 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera fotográfica digital Nikon DCM 1200 (Nikon Corporation, Tóqui, Japão). A quantificação de macrófagos foi realizada utilizando o software *Image J* (NIH, MD, EUA). A expressão de CD68 e CD206 em toda a secção transversal do músculo foi analisada e expressa como a porcentagem da área transversal total do músculo.

### **3.3.5 Ensaios de *Western Blotting* (WB)**

O músculo GC foi dissecado no sentido caudo-rostral e os fragmentos de interesse (ventre lateral e medial) foram coletados, submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido e permaneceram em freezer a -80 °C. A extração de proteína total do tecido foi realizada utilizando um tampão de extração (KCl, 90 mM; HEPES, 10 mM; MgCl<sup>2+</sup>, 3

mM; EDTA, 5 mM; glicerol, 1 %; DTT, 1 mM; SDS, 0,04 %; aprotinina, 20 mM; pepstatina, 20 mM; leupeptatina, 20 mM; PMSF, 40 µM; ortovanadato de sódio, 100 mM). O conteúdo proteico das amostras foi dosado pelo método de Bradford [122]. Após a quantificação de proteína total, as amostras foram diluídas em um mesmo volume de tampão Laemmli (2x Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad, Estados Unidos), contendo 54 mg/mL de DTT [123] e em seguida fervidas em banho-maria por 5 minutos e aplicadas (duplicadas) em gel de poliacrilamida (gel de gradiente – 4 % e 20 %), o qual foi submetido à eletroforese com corrente contínua de 120 V e corrente constante de 2500 mA.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 µm de diâmetro) de acordo com a técnica descrita por Towbin *et al.* (1979) [124]. Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) a 5 % em solução TBST (10 mM de Tris; 0,15 M de NaCl; 0,1 % de Tween® 20) por 1 hora e 30 minutos, as membranas foram incubadas com anticorpos primários (Tabela 2), por 16 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução TBST por 3 vezes durante 10 minutos sob agitação e incubadas à temperatura ambiente com os anticorpos secundários (Tabela 2), por 1 hora e 30 minutos. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 10 minutos com solução TBST para que posteriormente fossem visualizadas. As membranas foram reveladas em aparelho UVITEC, utilizando o Kit ECL de quimioluminescência (Amershan Biosciences, NJ, Estados Unidos) e foram analisadas quanto à densidade das bandas marcadas, utilizando o programa *Image J* (NIH, MD, EUA). A análise dos dados foi realizada pela média das diferenças percentuais entre os diferentes grupos experimentais. A correção foi realizada pela densidade óptica para GAPDH (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, EUA), considerando as amostras dos animais *Naïve* como o padrão para a normalização dos resultados.



Tabela 2 – Anticorpos primários e secundários utilizados para análise proteica por WB.

<b>Proteínas Analisadas</b>	<b>Origem</b>	<b>Animal de Origem</b>	<b>Titulação</b>	<b>Peso molecular</b>
Pax7	Developmental Studies Hybridoma Bank, JP	Galinha	1:500	57.5 kDa/36 kDa
MRF4	Invitrogen, EUA	Camundongo	1:500	30 kDa
MYH3 (policonal)	OriGene Technologies, EUA	Coelho	1:500	240 kDa
TGF- $\beta$ 1	Abcam, UK	Coelho	1:1000	44 kDa
FGF-6	Abcam, UK	Coelho	1:1000	24 kDa
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, UE	Camundongo	1:5000	37 kDa
HRP anti-galinha	Santa Cruz Biotechnology, UE	Cabra	1:5000	69 kDa
HPR anti-camundongo	GE Healthcare Life Sciences, BRA	Cabra	1:5000	17 kDa
HRP anti- coelho	GE Healthcare Life Sciences, UK	Burro	1:5000	50 kDa

### 3.3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Software *GraphPad Prism*, versão 8 (*GraphPad Software* Incorporation, Califórnia, Estados Unidos). As comparações entre os grupos foram conduzidas a partir da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (*One-way* ou *Two-way*, respectivamente), e em seguida foi realizado pós-teste de Bonferroni quando a análise de variância apresentou diferença estatisticamente significativa. Os dados foram representados em gráficos com a média e erro padrão da média (E.P.M). Para todos os testes, o nível de significância assumido foi de  $p < 0,05$  [125].

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Eficácia da indução da miosite com CFA e o efeito da PBMT (LLLT e LEDT) sobre a alodinia tátil

O primeiro parâmetro analisado sobre a instalação da miosite foi o desenvolvimento de alterações da nocicepção. O resultado obtido com relação a alodinia tátil demonstrou que a injeção intramuscular (i. m.) de CFA no músculo GC levou à diminuição do limiar nociceptivo dos animais com miosite no 6º dia (grupos CFA, CFA + LLLT e CFA + LEDT) em relação ao grupo *Naïve* (Figura 9, painel A). Com relação ao lado contralateral à injeção de CFA, não foram observadas diferenças significativas (Figura 9, painel B).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao longo de todo período experimental do grupo CFA em relação ao grupo *Naïve* nos dias que se seguiram a injeção de CFA, conforme descrito: 6º dia [*Naïve* ( $14,57 \pm 1,38$ ) versus (vs) CFA ( $3,21 \pm 1,28$ )]; 7º dia [*Naïve* ( $11,92 \pm 4,97$ ) vs. CFA ( $3,91 \pm 2,39$ )]; 8º dia [*Naïve* ( $11,3 \pm 5,94$ ) vs. CFA ( $2,49 \pm 0,77$ )]; 9º dia [*Naïve* ( $12,96 \pm 3,90$ ) vs. CFA ( $3,93 \pm 1,21$ )]; 10º dia [*Naïve* ( $11,29 \pm 3,77$ ) vs. CFA ( $3,25 \pm 1,63$ )]; 11º dia [*Naïve* ( $12,92 \pm 3,42$ ) vs. CFA ( $3,21 \pm 1,28$ )]. Também foram observadas diferenças significativas entre o grupo CFA em comparação ao grupo Veículo nos seguintes períodos após a injeção de CFA: 6º dia [Veículo ( $9,75 \pm 4,89$ ) vs. CFA ( $3,21 \pm 1,28$ )]; 7º dia [Veículo ( $11,87 \pm 4,54$ ) vs. CFA ( $3,21 \pm 1,28$ )]; 8º dia [Veículo ( $15,13 \pm 0$ ) vs. CFA ( $2,49 \pm 0,77$ )]; 9º dia [Veículo ( $10,97 \pm 3,16$ ) vs. CFA ( $3,93 \pm 1,21$ )]; 10º dia [Veículo ( $10,97 \pm 3,16$ ) vs. CFA ( $3,25 \pm 1,63$ )]; 11º dia [Veículo ( $15,13 \pm 0$ ) vs. CFA ( $3,21 \pm 1,28$ )].

Ainda, foi observada melhora significativa ( $p < 0,05$ ) da alodinia tátil nos animais tratados com LLLT (grupo CFA + LLLT) e LEDT (grupo CFA + LEDT) em relação ao grupo sem tratamento (CFA) no lado ipsilateral (Figura 9, painel A). A melhora da alodinia tátil no grupo CFA + LLLT foi observada após a segunda sessão e permaneceu até a última sessão de tratamento. A porcentagem (%) de melhora foi de aproximadamente 51 % após a primeira sessão [CFA + LLLT ( $10,79 \pm 4,89$ ) vs. CFA ( $3,91 \pm 2,39$ )]; 78 % após segunda sessão [CFA + LLLT ( $11,30 \pm 6,64$ ) vs. CFA ( $2,49 \pm 0,77$ )]; 78 % após terceira sessão [CFA + LLLT ( $14 \pm 1,95$ ) vs. CFA ( $3,93 \pm 1,21$ )]; 71 % após quarta sessão [CFA + LLLT ( $11,30 \pm 6,64$ ) vs. CFA ( $3,25 \pm 1,63$ )]; 66 % após

quinta sessão [CFA + LLLT ( $11,79 \pm 3,31$ ) vs. CFA ( $3,21 \pm 1,28$ )], conforme demonstrado na Figura 9 (painel A).

Com relação ao grupo CFA + LEDT, o efeito da terapia foi visto após a segunda [CFA + LEDT ( $10,71 \pm 3,82$ ) vs. CFA ( $3,67 \pm 3,06$ )], quarta [CFA + LEDT ( $11,79 \pm 3,31$ ) vs. CFA ( $3,25 \pm 1,63$ )] e quinta sessão [CFA + LEDT ( $11,92 \pm 5,56$ ) vs. CFA ( $3,21 \pm 1,28$ )], sendo a melhora de aproximadamente 73 %, 75 % e 67 %, respectivamente, em relação ao grupo não tratado (Figura 9, painel A).

Na comparação entre os grupos com os dois tipos de tratamentos (CFA + LLLT e CFA + LEDT) não houve diferença estatística em ambos os lados.

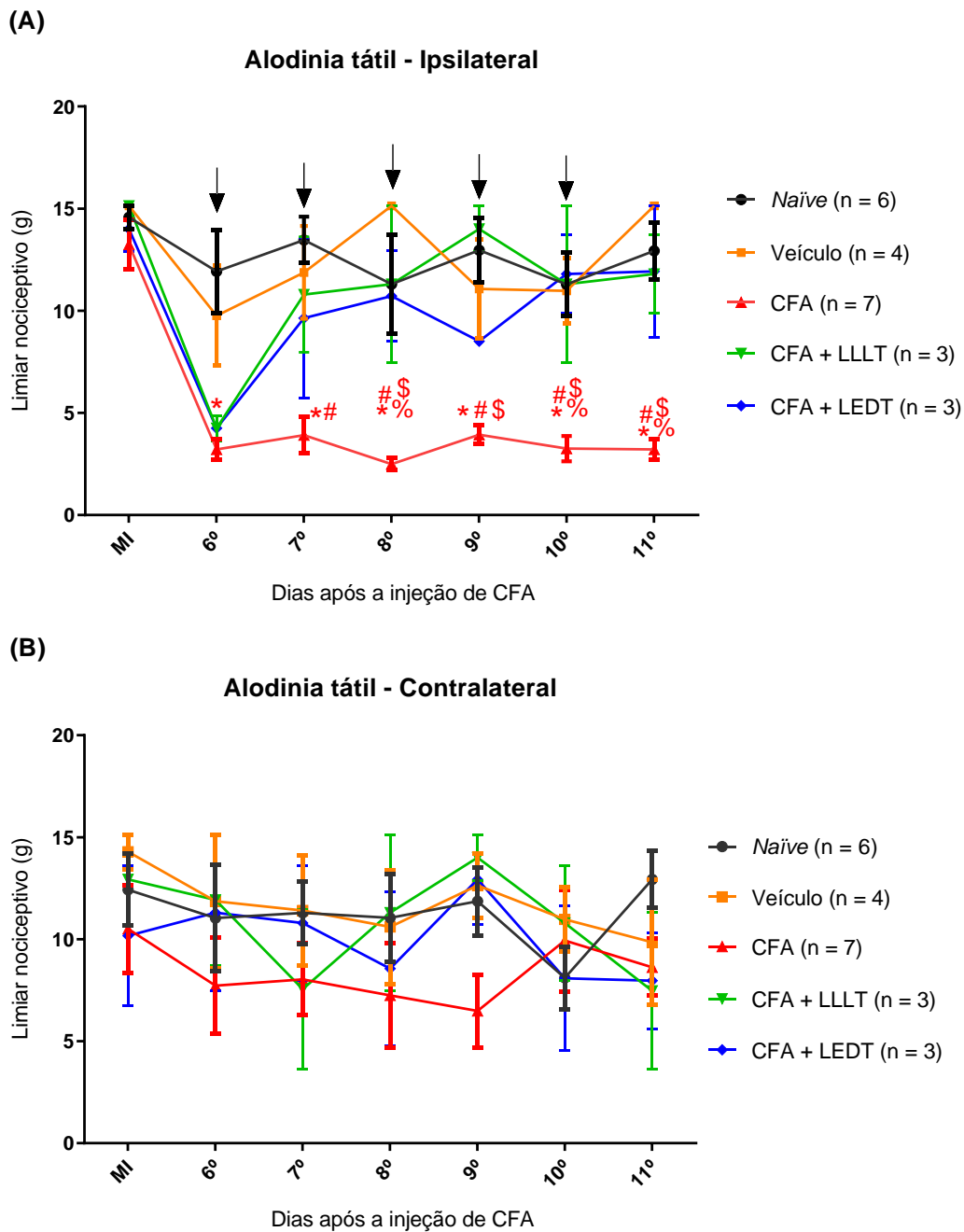


Figura 9 – Análise comportamental da alodinia tátil dos animais com miosite e tratados com LLLT ou LEDT (teste de von Frey filamentos). Os resultados do teste foram expressos em gramas (g). O limiar nociceptivo dos animais foi definido antes de qualquer procedimento (medida inicial; MI) e depois de 6, 7, 8, 9, 10 e 11 dias após a injeção do CFA ou veículo. As setas (↓) indicam os dias em que as terapias (LLLT ou LEDT) foram realizadas. No painel (A) está representado o lado ipsilateral à injeção de CFA ou veículo e no painel (B) está representado o lado contralateral às injeções. Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. Os símbolos (\*), (#), (\$) e (%) representam o valor de  $p < 0,05$  quando comparados os grupos *Naive*, Veículo, CFA + LLLT e CFA + LEDT (respectivamente aos símbolos) ao grupo CFA.

#### **4.2 Desenvolvimento de hiperalgesia mecânica após injeção de CFA e o efeito da PBMT (LLLT e LEDT) sobre este parâmetro**

Como mencionado anteriormente, a instalação da miosite foi avaliada por meio do desenvolvimento de alterações nociceptivas em ratos submetidos à injeção de CFA. Sobre a ocorrência de hiperalgesia mecânica, foi observado que a injeção i. m. de CFA no músculo GC levou à diminuição do limiar nociceptivo mecânico dos animais com miosite no 6º dia (grupos CFA, CFA + LLLT e CFA + LEDT) em relação ao grupo *Naïve*.

Assim como para alodinia tátil, a diminuição do limiar nociceptivo mecânico no grupo CFA foi observada interruptamente a partir do 6º dia após a injeção do CFA no lado ipsilateral à injeção do mesmo (Figura 10, painel A) e apenas no 10º dia após a injeção do CFA no lado contralateral (Figura 10, painel B), quando comparado ao grupo *Naïve* ( $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos CFA e Veículo.

Para o lado ipsilateral, as diferenças observadas do grupo CFA em relação ao grupo *Naïve* ocorreram nos seguintes dias após a injeção de CFA: 6º dia [*Naïve* (89,66 ± 24,27) vs. CFA (43 ± 12,06)]; 7º dia [*Naïve* (99,91 ± 20,80) vs. CFA (49,87 ± 14,90)]; 8º dia [*Naïve* (99,25 ± 15,98) vs. CFA (61,5 ± 6,69)]; 9º dia [*Naïve* (100,83 ± 17,73) vs. CFA (55,37 ± 8,72)]; 10º dia [*Naïve* (102,25 ± 9,10) vs. CFA (55,62 ± 18,75)]; 11º dia [*Naïve* (87,75 ± 25,29) vs. CFA (50,75 ± 12,06)]. Para o lado contralateral, a diferença entre os grupos CFA e *Naïve* foi observada apenas no 10º dia após a injeção. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com LLLT (CFA + LLLT) ou LEDT (CFA + LEDT) quando comparados ao grupo que recebeu apenas a injeção de CFA, em ambos os lados (Figura 10, painéis A e B).

Não houve diferença entre os grupos tratados com LLLT (CFA + LLLT) e LEDT (CFA + LEDT) tanto para o lado ipsilateral quanto para o lado contralateral.

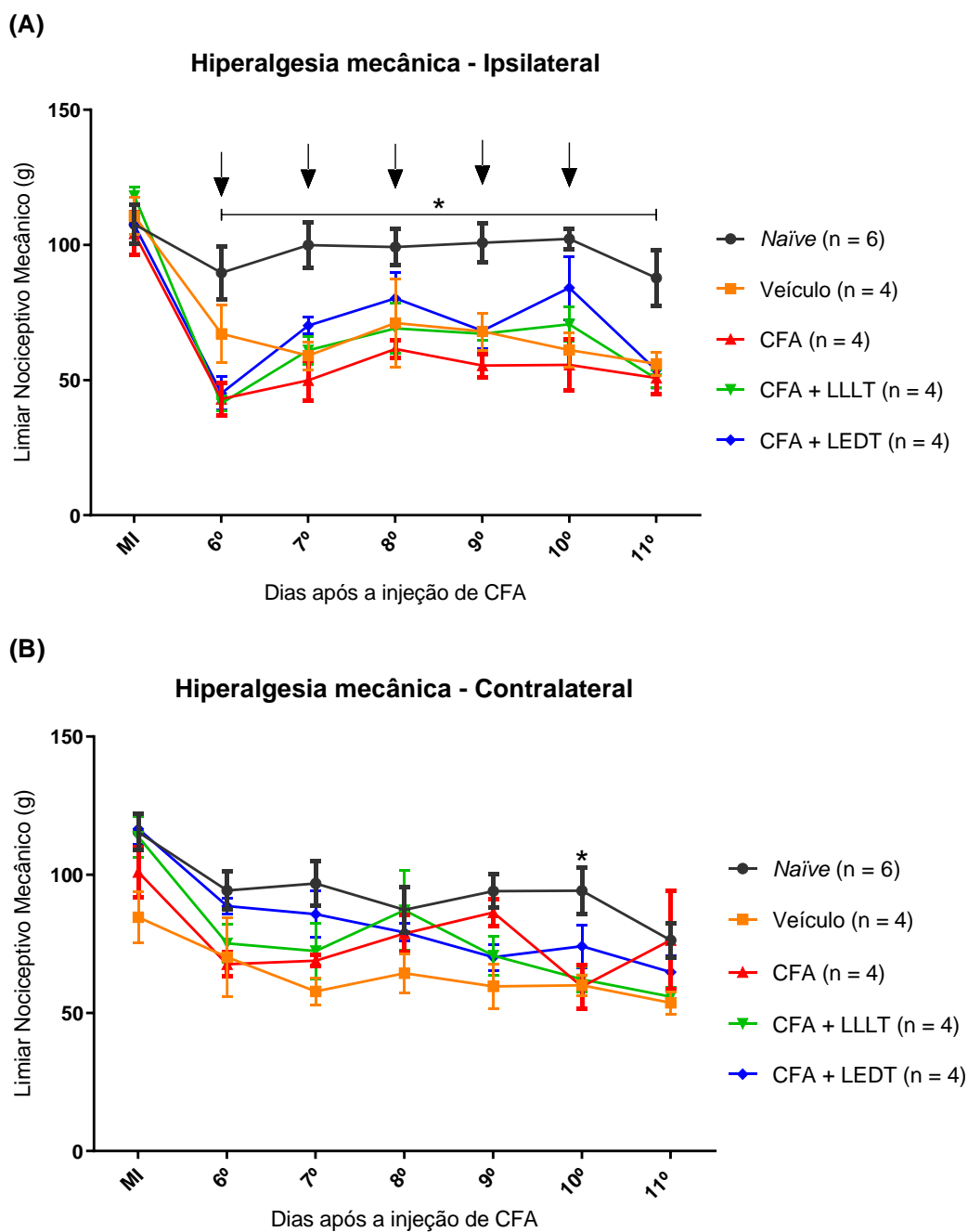


Figura 10 – Análise comportamental da hiperalgisia mecânica (teste de von Frey eletrônico) dos animais com miosite e tratados com LLLT ou LEDT. Os resultados dos testes de hiperalgisia mecânica foram expressos em gramas (g). O limiar nociceptivo dos animais foi definido antes de qualquer procedimento (medida inicial; MI) e depois de 6, 7, 8, 9, 10 e 11 dias após a injeção do CFA. As setas (↓) indicam os dias em que as terapias (LLLT ou LEDT) foram realizadas. No painel A está representado o lado ipsilateral e no painel B está representado o lado contralateral dos animais. Os resultados apresentam a média ± E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. O símbolo (\*) representa o valor de  $p < 0,05$  quando comparado o grupo *Naïve* ao grupo CFA.

### **4.3 Desenvolvimento de hiperalgesia térmica após injeção de CFA e o efeito da PBMT sobre este parâmetro**

Além da alodinia tátil e hiperalgesia mecânica observadas durante a instalação da miosite, foi avaliada também hiperalgesia térmica. Houve diminuição da latência (segundos) no lado ipsilateral do grupo CFA no 8º, 9º e 10º dia após a injeção de CFA em relação a medida inicial (MI). Também foram observadas diferenças estatísticas na comparação do grupo Veículo em relação ao grupo CFA no 8º dia [Veículo ( $16,11 \pm 5,34$ ) vs. CFA ( $7,73 \pm 2,55$ )] e do grupo *Naïve* em relação ao grupo CFA no 11º dia após a injeção de CFA [*Naïve* ( $17,78 \pm 0,71$ ) vs. CFA ( $5,56 \pm 0,63$ )].

No que diz respeito aos grupos tratados (CFA + LLLT e CFA + LEDT) não houve diferença estatística ao compará-los ao grupo CFA, tanto para o lado ipsilateral (Figura 11, painel A) quanto para o lado contralateral à injeção de CFA (Figura 11, painel B). Não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados, CFA + LLLT e CFA + LEDT, em ambos os lados.

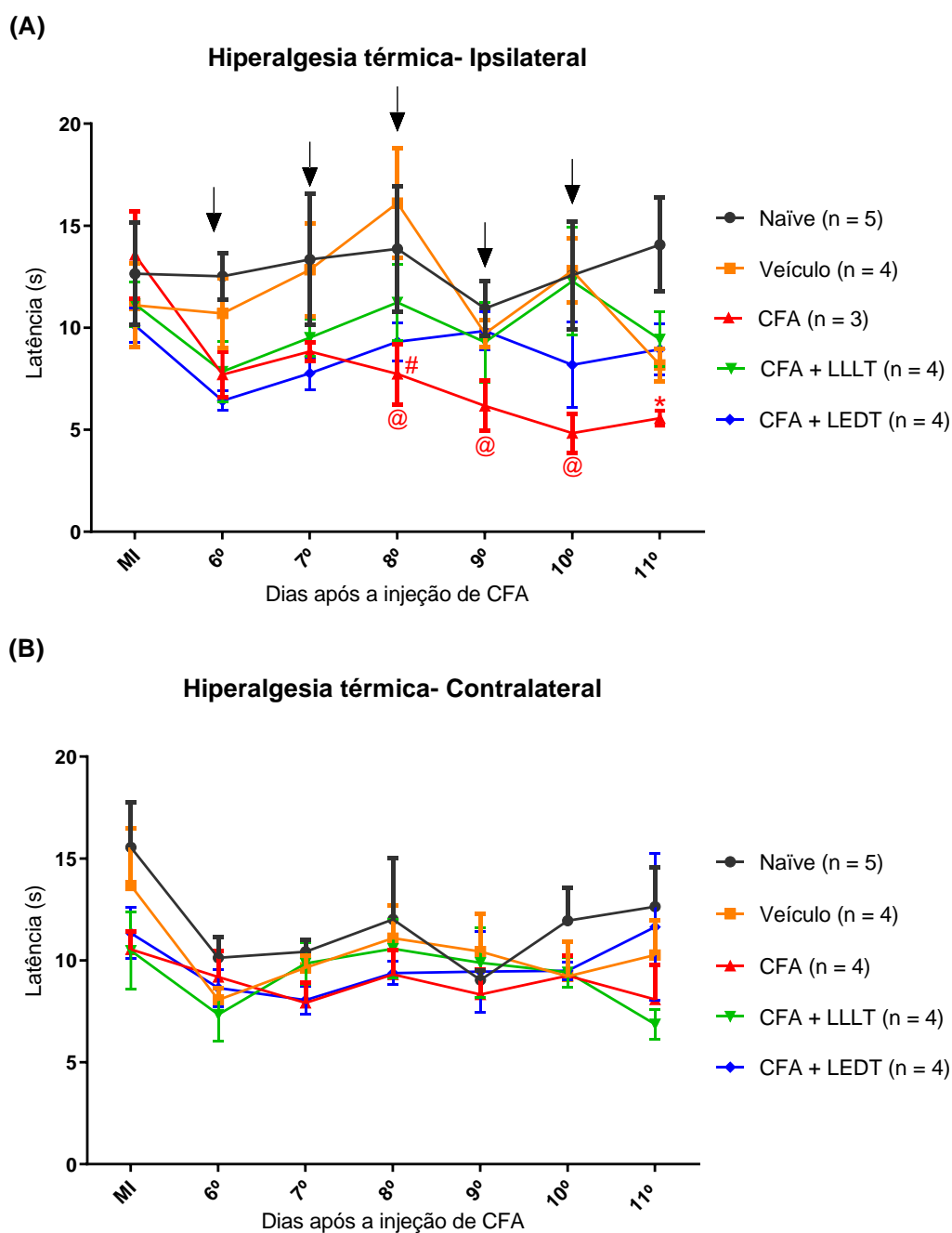


Figura 11 – Análise comportamental da hiperalgisia térmica (teste de Hargreaves) dos animais com miosite e tratados com LLLT ou LEDT. Os resultados dos testes de hiperalgisia térmica foram expressos como latência, em segundos (s). A latência dos animais foi definida antes de qualquer procedimento (medida inicial; MI) e depois de 6, 7, 8, 9, 10 e 11 dias após a injeção do CFA. As setas (↓) indicam os dias em que as terapias (LLLT ou LEDT) foram realizadas. No painel A está representado o lado ipsilateral e no painel B está representado o lado contralateral dos animais. Os resultados apresentam a média ± E.P.M. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. Os símbolos (\*) e (#) representam o valor de  $p < 0,05$  quando comparado o grupo *Naïve* e *Veículo*, respectivamente, ao grupo *CFA*. O símbolo (@) representa o valor de  $p < 0,05$  da comparação interna do grupo *CFA* (medida inicial em relação aos demais dias).



## 4.2 Desenvolvimento do edema muscular a partir da injeção de CFA e o efeito da PBMT (LLLT e LEDT) sobre a resposta edematogênica no músculo GC

Após a indução da miosite, foi observada a presença de edema muscular em todos os animais submetidos à injeção de CFA no músculo GC (ipsilateral). Este aumento foi significativo ( $p < 0,05$ ), no grupo CFA ( $99,17 \pm 29,72$ ) em relação aos grupos *Naïve* ( $26,26 \pm 9,58$ ) e Veículo ( $18,18 \pm 0$ ) (73 % e 81 %, respectivamente). Após a confirmação da presença de edema nos animais com miosite, o objetivo seguinte foi observar se a PBMT poderia melhorar o edema muscular.

Foi observada diminuição do edema muscular dos grupos tratados com LLLT [CFA + LLLT ( $54,54 \pm 14,84$ );  $p < 0,05$ ] e LEDT [CFA + LEDT ( $54,54 \pm 14,84$ );  $p < 0,05$ ] quando comparados com o grupo CFA. Com isso, ambos os tratamentos diminuíram em aproximadamente 43 % o edema muscular em relação ao grupo CFA (Figura 12).

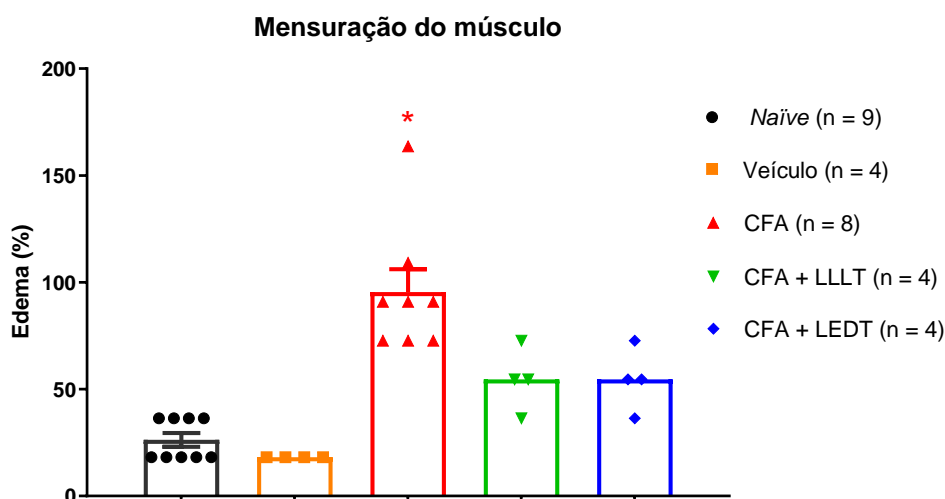


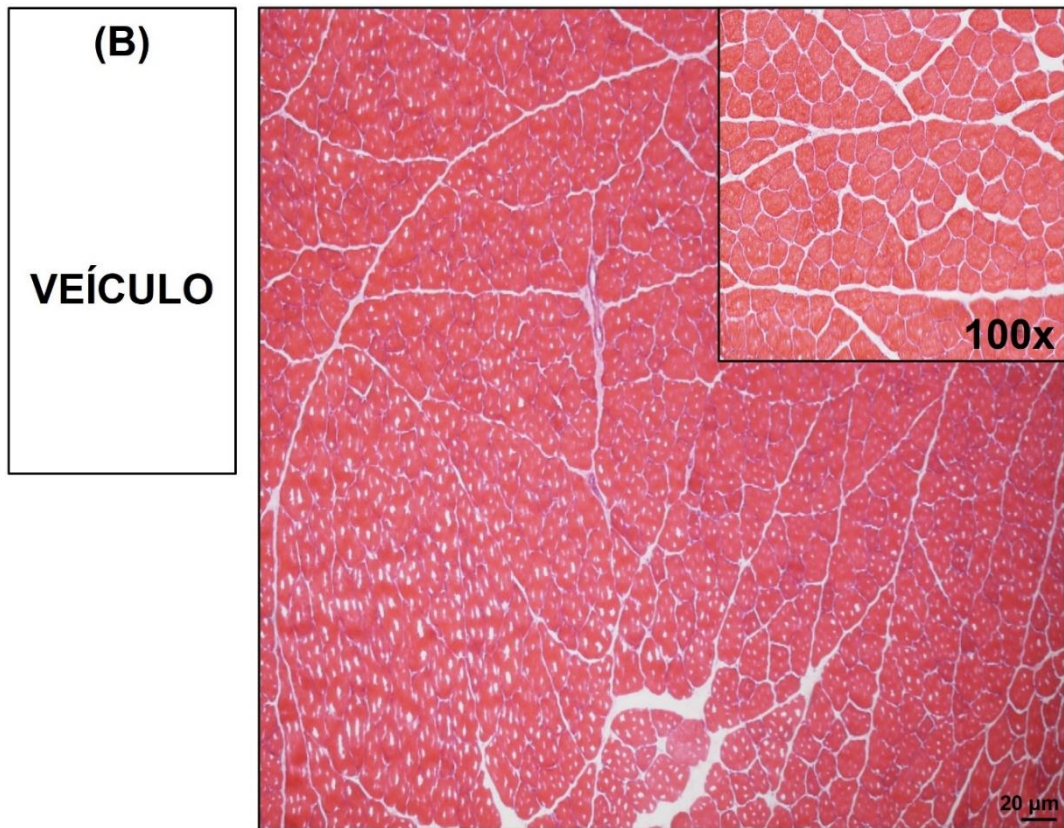
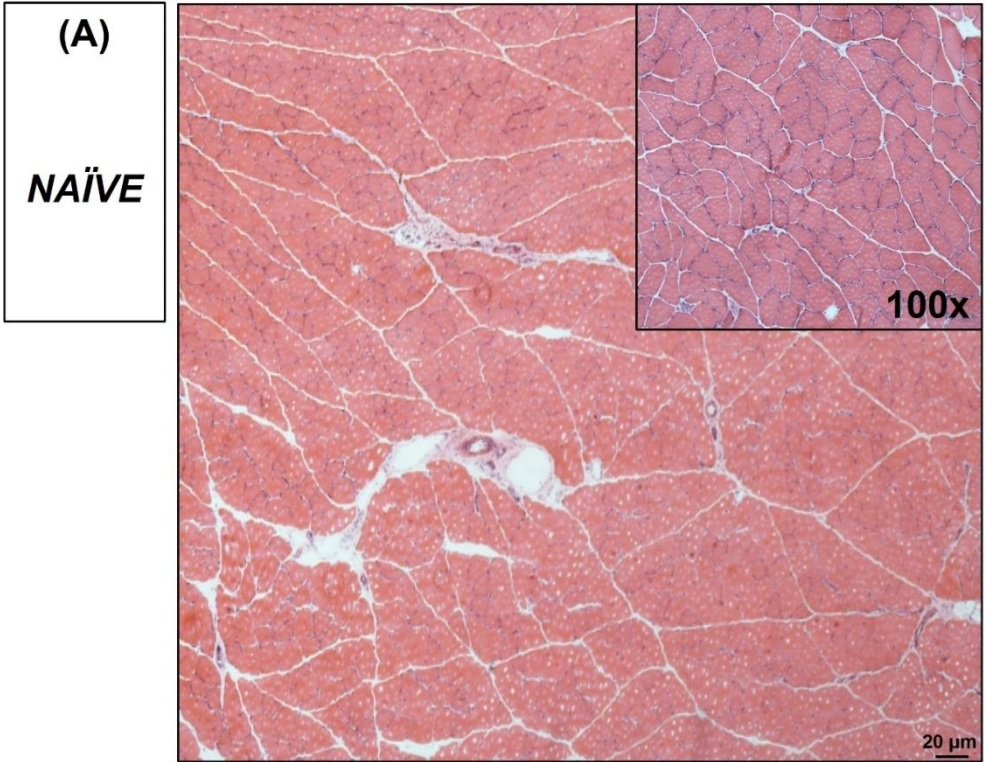
Figura 12 – Gráfico de barras representando a porcentagem (%) do edema muscular no músculo GC. O músculo GC foi mensurado por meio de paquimetria, antes (MI) e 11 dias após a injeção do CFA (MF) concomitante à finalização das 5 sessões de tratamento (LLLT ou LEDT). O edema foi expresso como o delta ( $\Delta$ ) da MI e MF (MF-MI). Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. O símbolo (\*) representa o valor de  $p < 0,05$  quando comparado aos demais grupos.

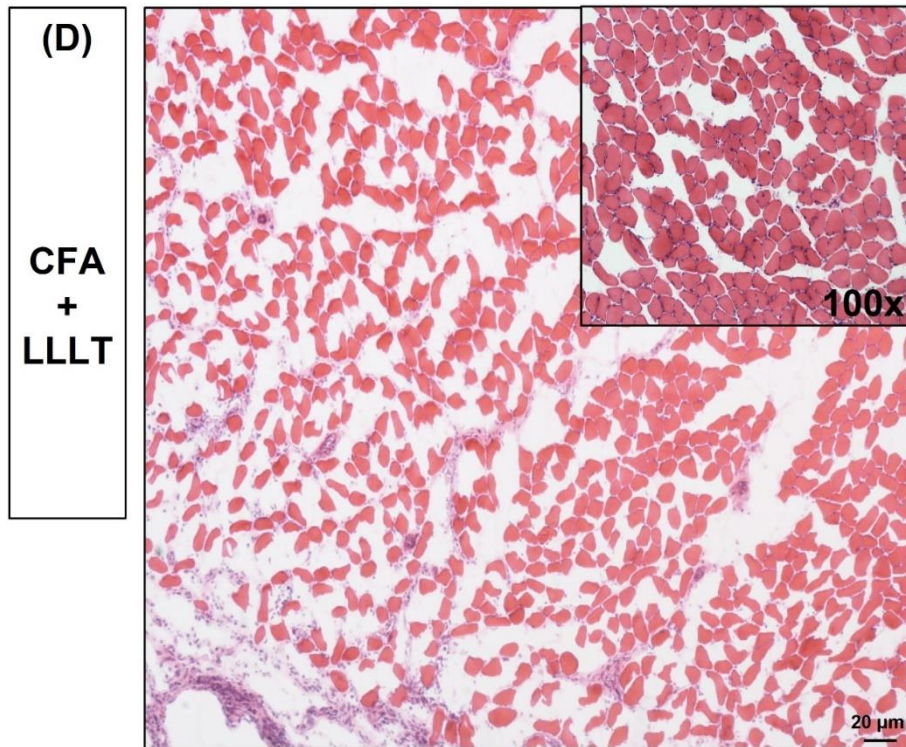
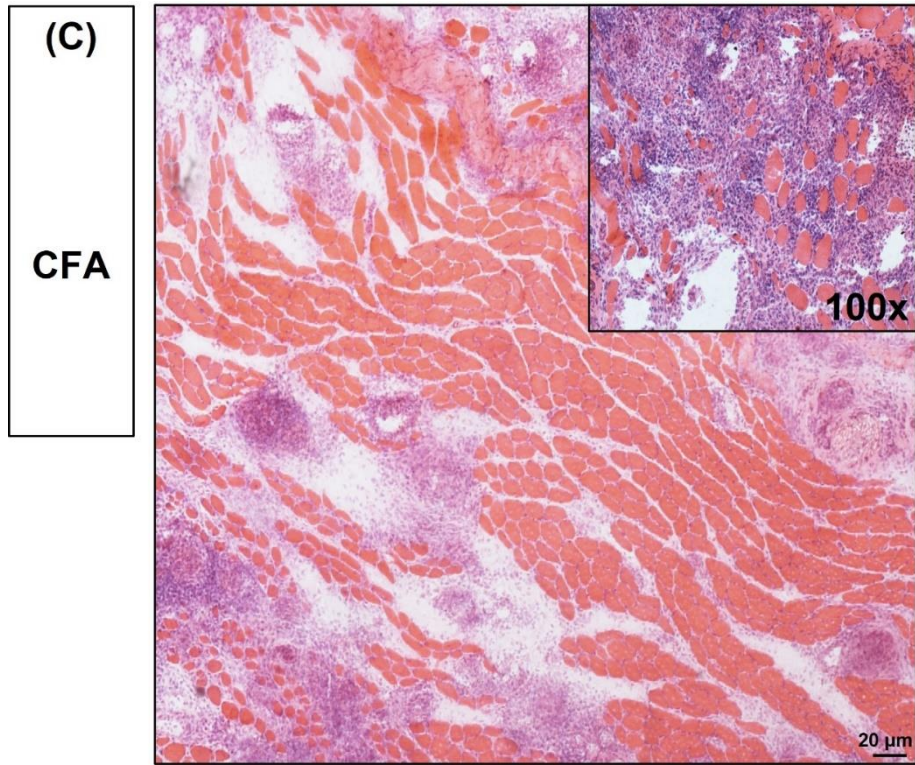
## 4.3 Ensaios histológicos

Para averiguar a extensão inflamatória promovida pela injeção do CFA e identificar se os tratamentos foram capazes de melhorar a miosite e acelerar o processo de regeneração muscular, foi realizada a análise histológica no músculo GC dos animais (Figura 13).

Com relação ao infiltrado inflamatório, não foram observados sinais deste nos grupos *Naïve* ( $38,58 \pm 61,74$ ; Figura 13, painel A) e Veículo ( $9,47 \pm 1,54$ ; Figura 13, painel B). Já no grupo CFA, pode-se observar grande extensão da área de infiltrado leucocitário, composto de células mononucleares, com característica compatível à macrófagos e linfócitos ( $250 \pm 69,31$ ; Figura 13, painel C), em comparação aos grupos *Naïve* e Veículo. Quando analisados os grupos tratados com LLLT e LEDT, foi observado que a área de infiltrado inflamatório é significativamente menor comparada ao grupo CFA [CFA + LLLT ( $46,1 \pm 10,07$ ; Figura 13, painel D) e CFA + LEDT ( $46,1 \pm 10,07$ ; Figura 13, painel E)]. Ainda, a área do infiltrado inflamatório do grupo CFA + LLLT é menor em comparação ao grupo CFA + LEDT, sendo estes diferentes estatisticamente.

Não houve diferença estatística entre os grupos tratados ou com LLLT (CFA + LLLT) ou com LEDT (CFA + LEDT) com relação ao número de fibras com núcleo centralizado e a área dessas fibras.





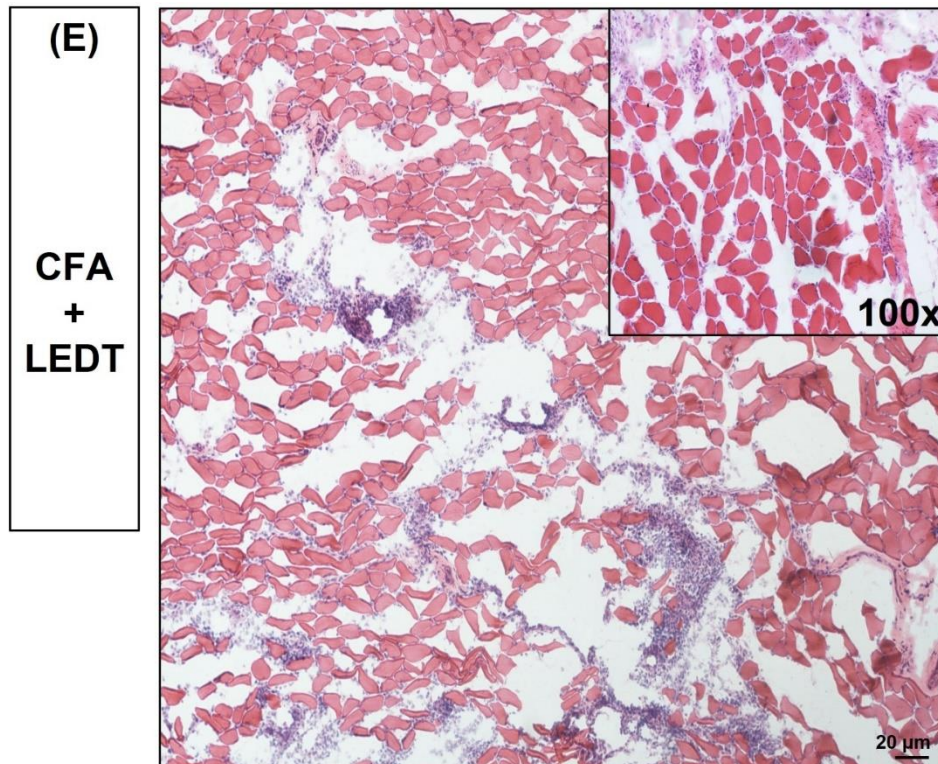


Figura 13 – Fotomicrografias representativas do músculo GC. Painéis (A) e (B) representam os grupos *Naïve* e *Veículo*, respectivamente; para ambos, o músculo GC apresenta aspecto regular, formado por fibras poligonais e ausência de infiltrados inflamatórios. (C): grupo CFA demonstrou extensa área de infiltrado inflamatório e fibras necróticas. Painéis (D) e (E) representam os grupos tratados com PBMT (CFA + LLLT e CFA + LEDT, respectivamente), demonstrando menor área de infiltrado. H&E; imagens com magnitude de 40X ou 100X (ampliação no canto superior direito); barras de escala equivalem a 20  $\mu$ m.

Quando avaliada a quantidade de fibras musculares com núcleo centralizado não houve diferenças entre os grupos *Naïve* ( $1,68 \pm 1,03$ ) e *Veículo* ( $0,86 \pm 0,19$ ) (Figura 14, painel B). A área dessas fibras musculares específicas (com núcleo centralizado) também não apresentou diferença para os respectivos grupos *Naïve* e *Veículo* [( $0,61 \pm 0,12$ ) e ( $0,62 \pm 0,13$ ), respectivamente], as quais se apresentaram com formato poligonal padrão e sem sinais de inflamação. No entanto, no grupo CFA foi possível identificar aumento do número de células com núcleo centralizado ( $4,99 \pm 2,87$ ) (Figura 14, painel B) e aumento da área das fibras musculares com núcleo centralizado ( $1,16 \pm 0,98$ ) (Figura 14, painel C), em comparação aos grupos *Naïve* e *Veículo*. Já nos grupos tratados com PBMT (CFA + LLLT e CFA + LEDT), houve aumento da quantidade de células com núcleo centralizado [CFA + LLLT ( $2,71 \pm 1,07$ ); CFA + LEDT ( $2,95 \pm 2,45$ )] (Figura 14, painel B), bem como maior área de fibras com núcleo

centralizado [CFA + LLLT ( $0,37 \pm 0,10$ ); CFA + LEDT ( $0,39 \pm 0,18$ )] quando comparados com os grupos *Naïve* e Veículo (Figura 14, painel C) e o oposto foi observado em comparação ao grupo CFA. Isso pois, os grupos CFA + LLLT e CFA + LEDT apresentaram menor quantidade células com núcleo centralizado e menor área de fibras com núcleo centralizado quando comparados ao grupo CFA (Figura 14, painel B e C).

Na figura 14 estão representadas as quantificações da área de infiltrados inflamatórios [ $\mu\text{m}^2$ ]; (painel A)] das fotomicrografias, acerca da quantidade de fibras musculares com núcleo centralizado (painel B) e área das fibras com núcleo centralizado [ $\mu\text{m}^2$ ]; (painel C)], sendo que o grupo CFA é diferente estatisticamente dos demais grupos (*Naïve*, Veículo, CFA + LLLT e CFA + LEDT;  $p < 0,05$ ).

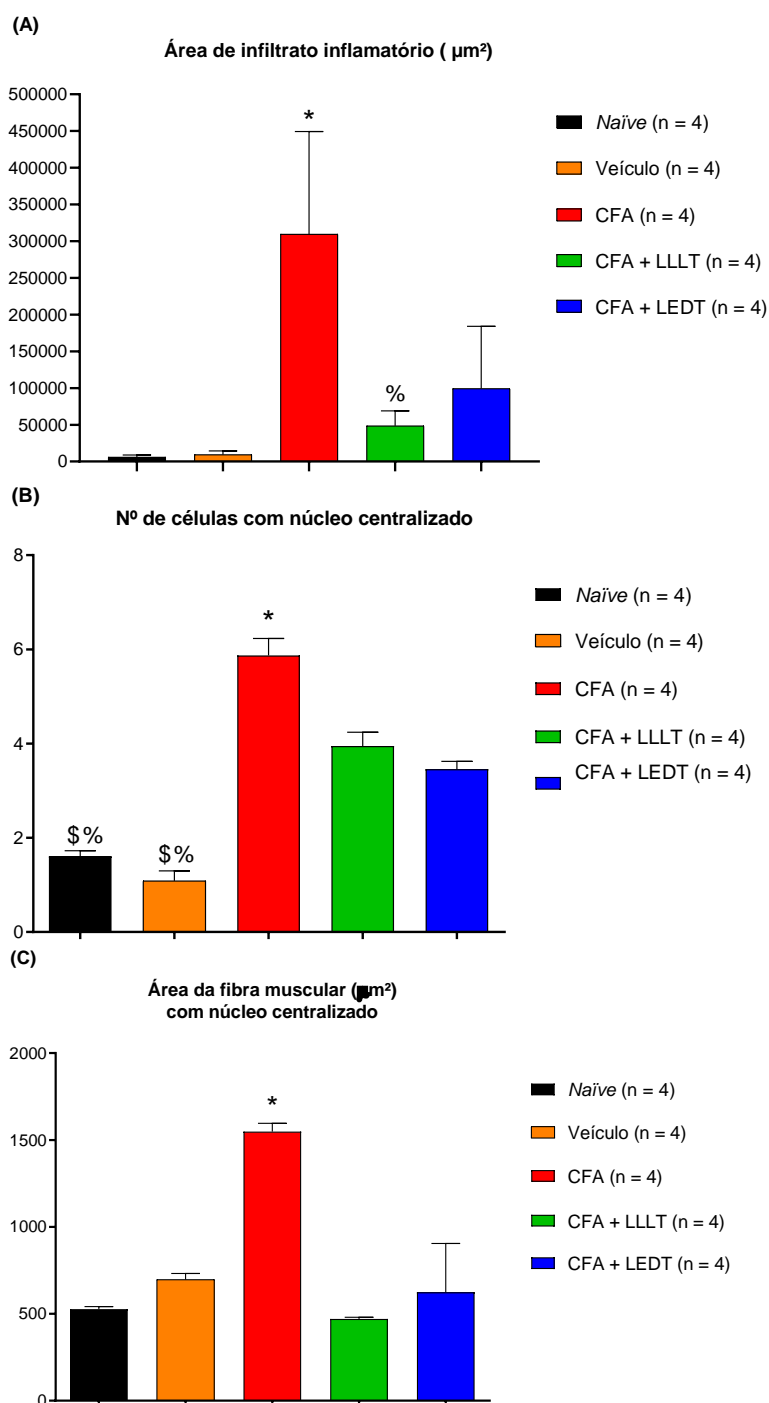


Figura 14 - Gráficos de barras representativos das quantificações da área de infiltrados inflamatórios, número de células com núcleo centralizado e área das fibras musculares com núcleo centralizado. Painel (A) representa a quantificação da área ( $\mu\text{m}^2$ ) do infiltrado inflamatório para todos os grupos experimentais; Painel (B) representa a quantificação do número de células com núcleo centralizado e em (C) a área dessas fibras para todos os grupos experimentais; o grupo CFA (barra vermelha) mostra maior área com infiltrado inflamatório, maior quantidade de fibras com núcleo centralizado e maior área dessas fibras em comparação aos demais grupos. Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. Os símbolos (\*), (\$) e (%) representam o valor de  $p < 0,05$  quando comparado aos demais grupos, grupo CFA + LLLT e grupo CFA + LEDT respectivamente.

#### 4.4 Ensaio de Imuno-histoquímica para marcação da incidência de macrófagos

A incidência de macrófagos foi analisada no músculo GC direito (ipsilateral à injeção de CFA) no 11º dia do protocolo experimental.

O grupo *Naïve* apresentou menor número de macrófagos (fenótipo M1+M2; CD68+) marcados significativamente ( $210,75 \pm 120,51$ ; Figura 15, painel A) em relação ao grupo CFA e aos grupos tratados com LLLT ou LEDT ( $p < 0,05$ ). A diferença observada entre os grupos foi de 77 % para o grupo CFA ( $913,5 \pm 257,78$ ; Figura 15, painel C), 74 % para o grupo CFA + LLLT ( $884,75 \pm 324,16$ ; Figura 15, painel E) e 87 % para o grupo CFA + LEDT ( $1004,66 \pm 219$ ; Figura 15, painel G), todos comparados ao grupo *Naïve* (Figura 15, painel A).

Na análise específica para a marcação de macrófagos fenótipo M2 (CD206) foi observada diferença na comparação do grupo *Naïve* ( $289,25 \pm 76,85$ ; Figura 15, painel B) em relação aos grupos CFA ( $1074,5 \pm 146,47$ ; Figura 15, painel D) de 73 %, CFA + LLLT ( $1009,5 \pm 292,66$ ; Figura 15, painel F) de 67% e CFA + LEDT de 83 % ( $1184,33 \pm 235,71$ ; Figura 15, painel H). Não foi observada diferença estatística da incidência de macrófagos dos grupos tratados com LLLT ou LEDT na comparação com o grupo CFA, tanto para macrófagos com fenótipos M1+M2, como para o fenótipo apenas M2.

Não houve diferença ao comparar os grupos tratados CFA + LLLT e CFA + LEDT com relação a incidência de macrófagos com fenótipos M1+M2 ou o fenótipo M2.



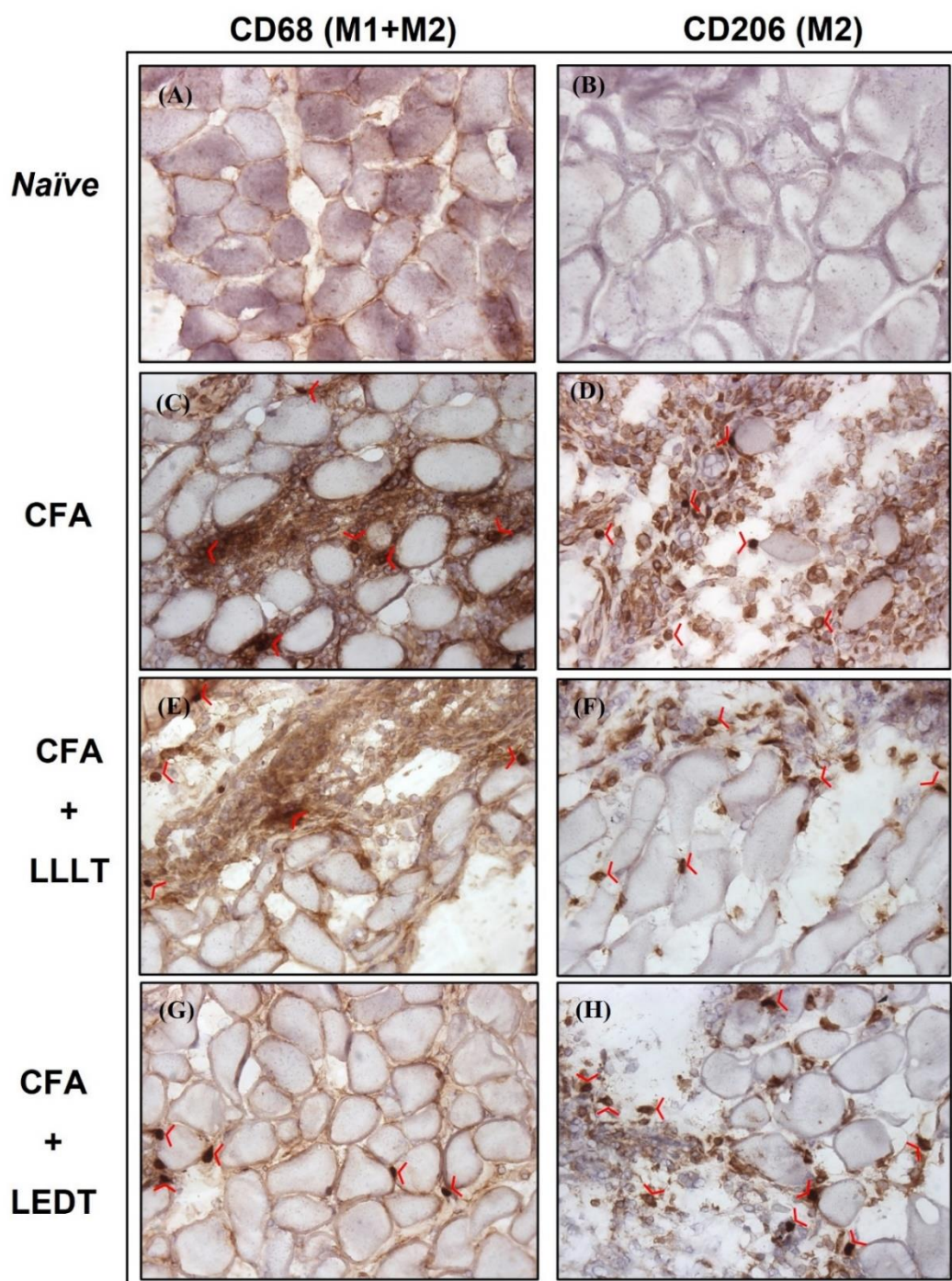
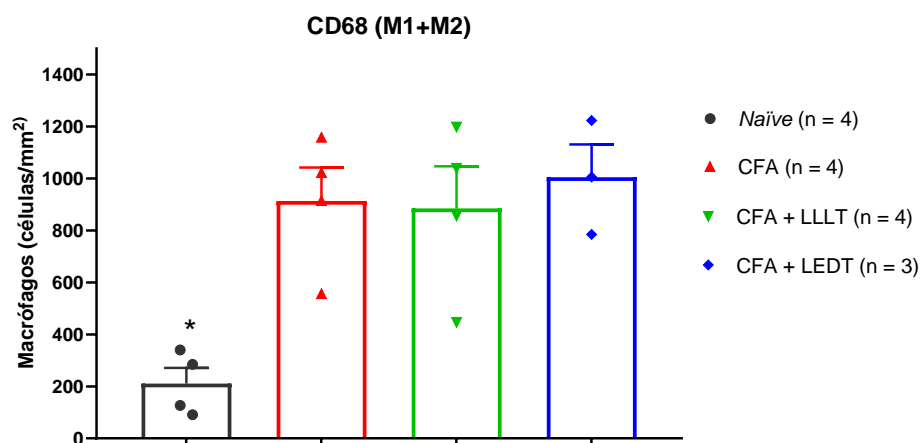


Figura 15 – Incidência de macrófagos no músculo GC com base na marcação de fenótipos tipo M1 e M2. Painéis A e B: grupo *Naïve* (n = 4; um corte por rato, total de 4 ratos por grupo); painéis C e D: grupo CFA (n = 4; um corte por rato, total de 4 ratos por grupo); painéis E e F: grupo CFA + LLLT (n = 4, um corte por rato, total de 4 ratos por grupo); painéis G e H: grupo CFA + LEDT (n = 3, um corte por rato, total de 3 ratos por grupo). As cabeças de setas (*arrowheads*) vermelhas indicam a marcação de macrófagos para os fenótipos tipo M1+M2 (CD68+) (painéis A, C, G e E) e apenas tipo M2 (CD206+) (painéis B, D, F, H). Objetiva de 40x.

Na figura 16 estão apresentados os gráficos das quantificações da incidência dos macrófagos (células por mm<sup>2</sup>) com fenótipo M1+ M2 (CD68) (painel A) e fenótipo M2 (CD206) (painel B). Foram observadas diferenças significativas apenas do grupo *Naïve* em relação aos demais grupos ( $p > 0,05$ ).

(A)



(B)

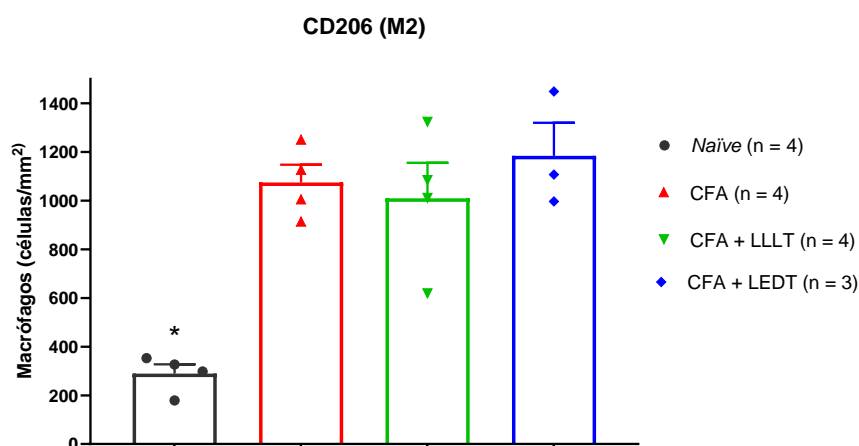


Figura 16 – Gráfico de barras da quantificação da incidência de macrófagos (células/mm<sup>2</sup>) com base na marcação de fenótipos tipo M1 e M2 no músculo GC. Painel A: quantificação de macrófagos com fenótipos tipo M1+M2 (CD68+); painel B: quantificação de macrófagos com fenótipo tipo M2 (apenas) (CD206+). Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. O símbolo (\*) representa o valor de  $p < 0,05$  na comparação do grupo *Naïve* aos demais grupos.

## 4.5 Ensaios de Western Blotting (WB) no músculo gastrocnêmio

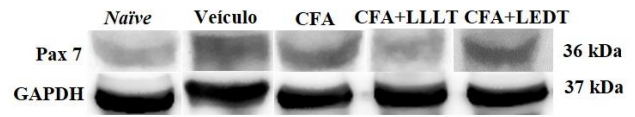
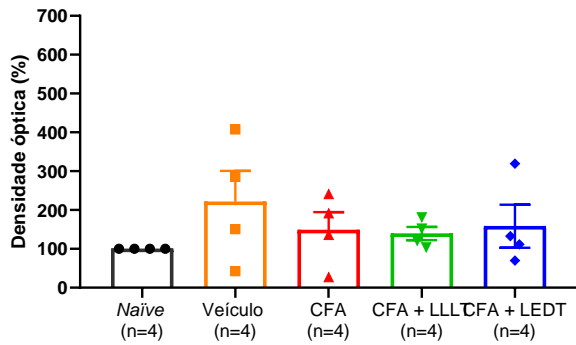
### 4.5.1 Quantificação da expressão proteica de Pax7 após a injeção de CFA e o tratamento com LLLT e LEDT

Após a finalização dos testes comportamentais, no 11<sup>o</sup> após a injeção de CFA, os animais foram eutanasiados e os músculos GCs direitos (ipsilateral à injeção de CFA) e esquerdos (contralateral) foram coletados, armazenados e processados para o ensaio de WB. Para avaliar quantitativamente a expressão proteica de Pax7, importante fator de transcrição no processo de regeneração muscular. A análise de expressão proteica considerou separadamente duas bandas da proteína alvo: a primeira, com o peso molecular de 36 kDa, e a segunda, com peso molecular de 50 kDa.

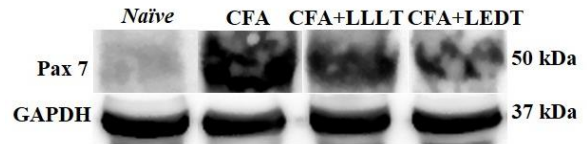
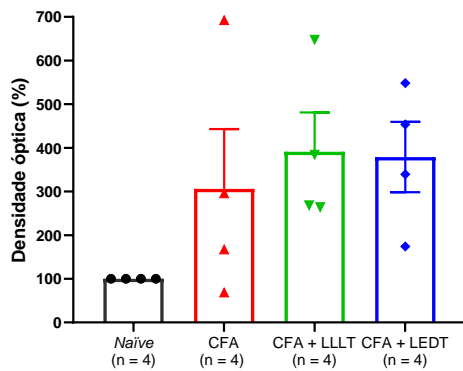
Não foram observadas alterações no padrão de expressão proteica de Pax7 (peso molecular de 36 kDa) entre os grupos experimentais para o lado ipsilateral (Figura 17, painel A), ou seja, todos os grupos demonstraram apenas expressão basal. O mesmo foi observado para o lado contralateral (GCs do lado esquerdo) (Figura 18, painel A). Para o peso molecular de 50 kDa, foi observado aumento (não significativo) da expressão de Pax7 nos grupos que receberam a injeção de CFA (CFA, CFA + LLLT e CFA + LEDT) em relação ao grupo *Naïve* (Figura 17, painel B). Nenhuma alteração da expressão de Pax7 (50 kDa) foi observada no lado contralateral (Figura 18, painel B). Ainda, não foi possível realizar quantificação do peso molecular de 50 kDa para o grupo Veículo, pois não foi observado banda aparente para ambos os lados (ipsilateral e contralateral).

Além da análise de cada peso molecular individualmente, na somatória dos dois pesos moleculares (36 kDa e 50 kDa) não se pôde observar diferenças estatísticas entre os grupos analisados para ambos os lados ([ipsilateral; Figura 17, painel C]; [contralateral; Figura 18, painel C]).

(A)



(B)



(C)

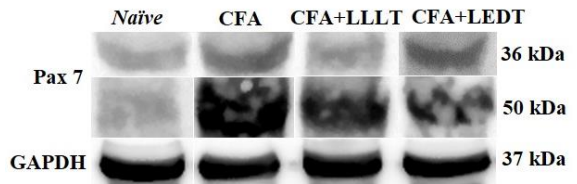
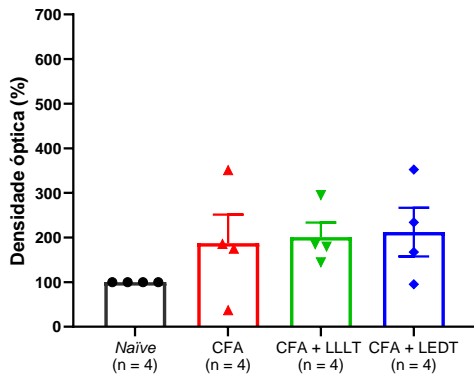


Figura 17 – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína Pax7 no músculo GC direito (ipsilateral). O painel (A) refere-se à quantificação da expressão proteica de Pax7, com peso molecular de 36 kDa; o painel (B) refere-se à quantificação da expressão proteica de Pax7, com peso molecular de 50 kDa; o painel (C) refere-se à somatória da expressão proteica de ambos os pesos moleculares (36 e 50 kDa). Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni.

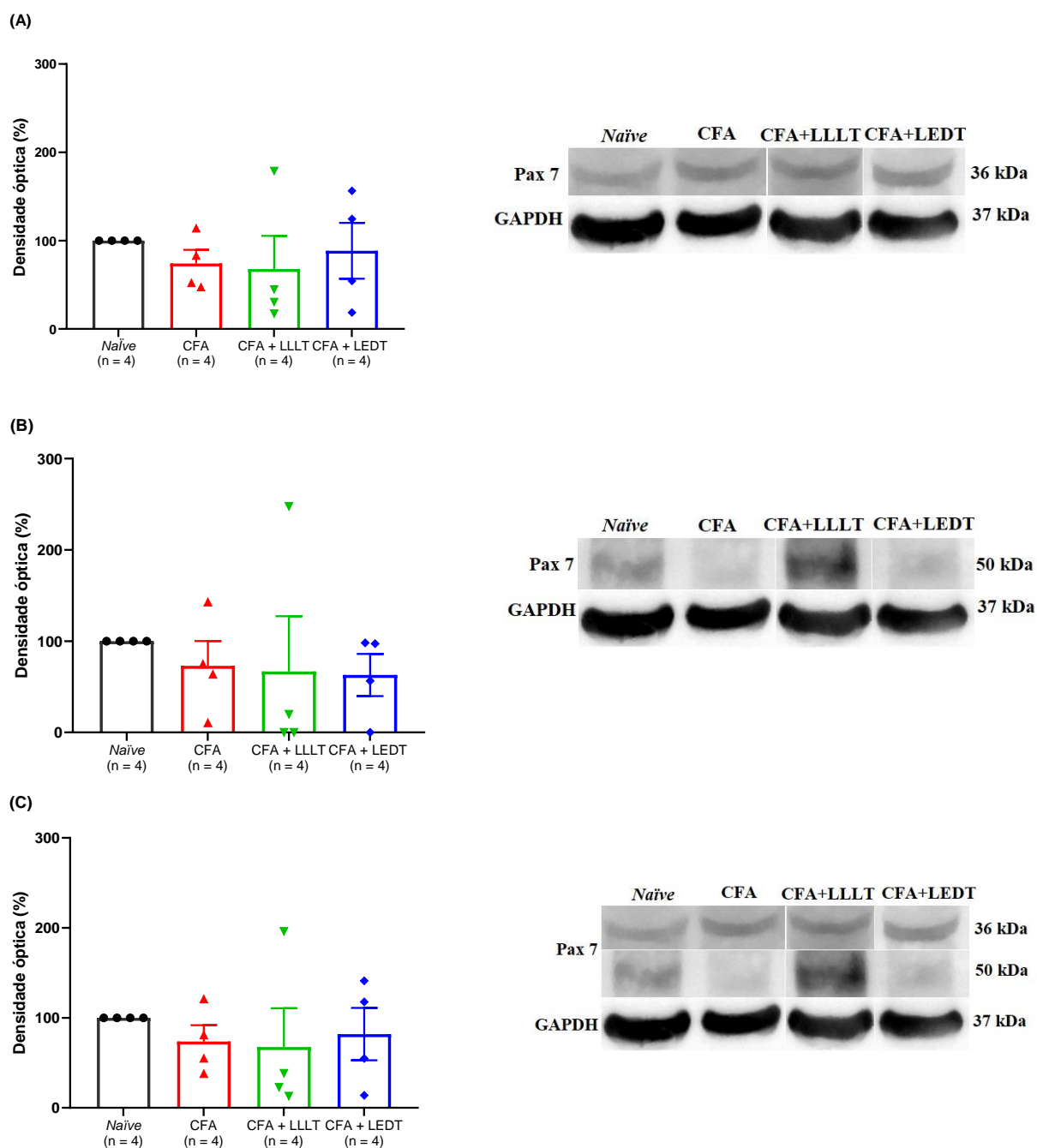


Figura 18 – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína Pax7 no músculo GC esquerdo (contralateral). O painel (A) refere-se à quantificação da expressão proteica de Pax7, com peso molecular de 36 kDa; o painel (B) refere-se à quantificação da expressão proteica de Pax7, com peso molecular de 50 kDa; o painel (C) refere-se à somatória da expressão proteica de ambos os pesos moleculares (36 e 50 kDa). Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni.

#### 4.5.2 Quantificação da expressão proteica do fator de crescimento de fibroblastos 6 (FGF-6) após o tratamento com LLLT e LEDT

Os resultados obtidos mostraram aumento na expressão proteica de FGF-6 (24 kDa) nos grupos CFA ( $1,16 \pm 0,98$ ) e tratado com LLLT ( $0,37 \pm 0,10$ ; CFA + LLLT) em relação aos grupos *Naïve* ( $0,61 \pm 0,12$ ) e Veículo ( $0,62 \pm 0,13$ ). Já no grupo tratado com LEDT ( $0,39 \pm 0,18$ ; CFA + LEDT), pôde-se observar diminuição da expressão de FGF-6 neste grupo em relação ao grupo CFA e CFA + LLLT e aumento em relação ao grupo Veículo ( $0,62 \pm 0,13$ ), porém sem diferença estatística significativa (Figura 19).

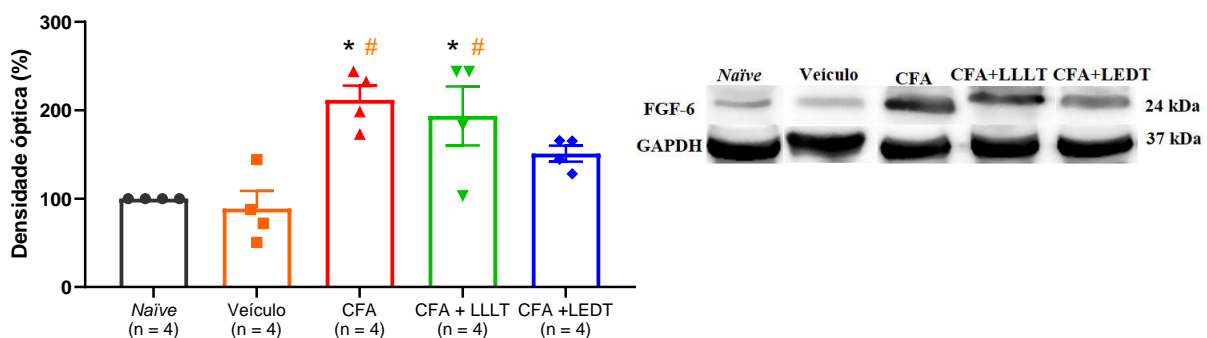


Figura 19 – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína FGF-6 no músculo GC direito (ipsilateral). Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. Os símbolos (\*) e (#) representam o valor de  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos *Naïve* e Veículo, respectivamente.

#### 4.5.3 Quantificação da expressão proteica do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) após a injeção de CFA e o tratamento com LLLT e LEDT

Ao avaliar a expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 (44 kDa), observou-se aumento da expressão dessa proteína nos grupos CFA ( $4,99 \pm 2,87$ ) e tratado com LLLT ( $2,71 \pm 1,07$ ; CFA + LLLT) em comparação ao grupo Veículo ( $0,86 \pm 0,19$ ). Por outro lado, houve diminuição da expressão de TGF- $\beta$ 1 no grupo tratado com LEDT ( $2,95 \pm 2,45$ ) em relação ao grupo CFA e CFA + LLLT (Figura 20).

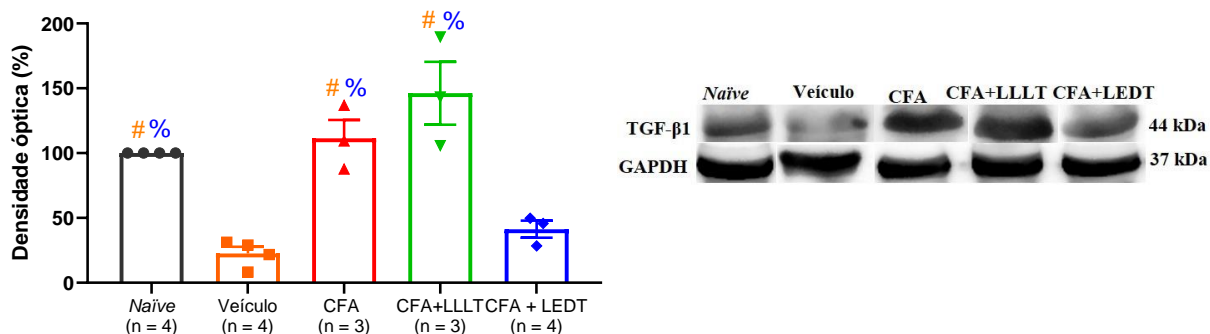


Figura 20 – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína TGF-β1 no músculo GC direito (ipsilateral). Os resultados apresentam a média ± E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. Os símbolos (#) e (%) representam o valor de  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos Veículo e CFA + LEDT, respectivamente.

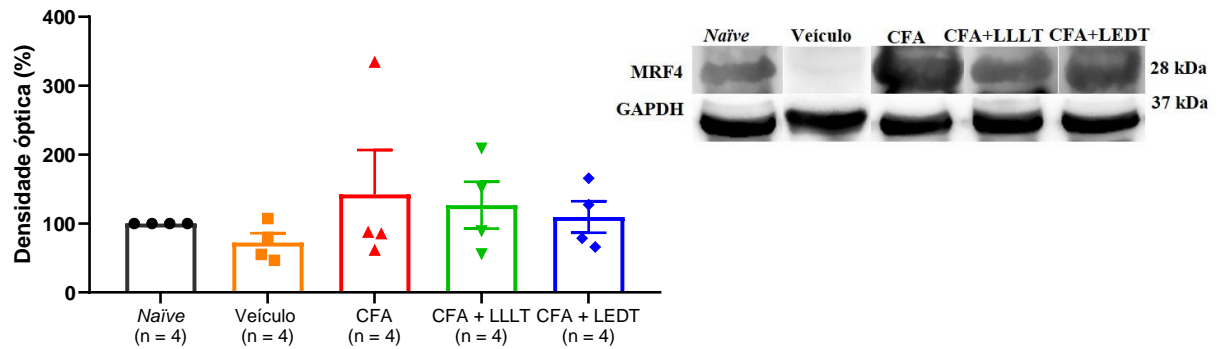
#### 4.5.4 Quantificação da expressão proteica do fator regulador miogênico 4 (MRF4) após a injeção de CFA e o tratamento com LLLT e LEDT

Igualmente ao observado quando analisada a proteína Pax7, o MRF4 é um importante fator de transcrição envolvido na regeneração muscular. A partir do ensaio de WB, também foram observadas duas bandas aparentes, uma de 28 kDa e outra de 36 kDa. Para todos os grupos experimentais foi realizada a análise das bandas de 28 kDa e 36 kDa isoladas e, logo após, foi analisada a somatória das duas bandas.

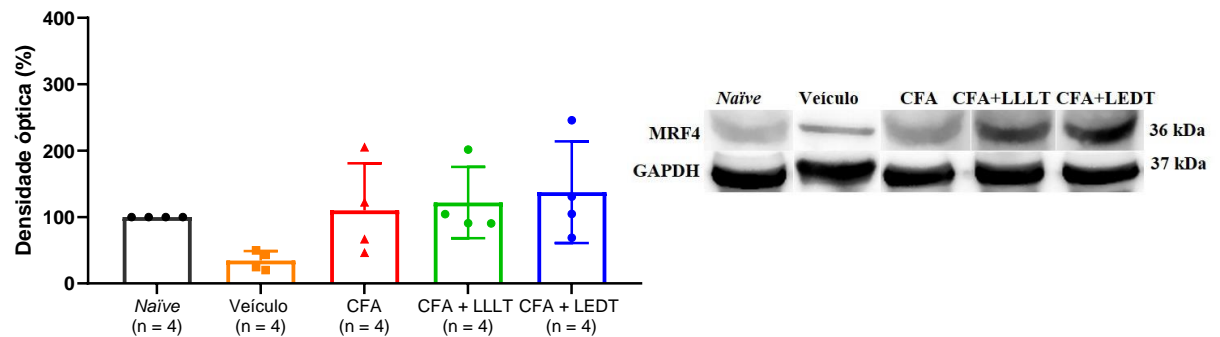
Não foram observadas alterações no padrão de expressão proteica de MRF4 nos pesos moleculares analisados [(28 kDa, Figura 21, painel A); 36 kDa, Figura 21, painel A)] entre os grupos experimentais referente ao lado ipsilateral, tampouco para a somatória das bandas apresentadas (Figura 21, painel C), ou seja, todos os grupos demonstraram apenas expressão basal.

Ao que se refere ao lado contralateral, não foi observada diferença estatística entre os grupos para o peso molecular de 28 kDa (Figura 22, painel A). Por outro lado, pôde-se observar diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dos grupos CFA ( $3,07 \pm 2,10$ ), CFA + LLLT ( $6,51 \pm 10,13$ ) e CFA + LEDT ( $3 \pm 1,28$ ) em relação ao grupo Naïve ( $100 \pm 0$ ) para o peso molecular de 36 kDa (Figura 22, painel B). Para a somatória das duas bandas em questão (28 kDa e 36 kDa), também houve diferença estatística do grupo Naïve ( $100 \pm 0$ ) em relação aos grupos CFA ( $9,32 \pm 3,32$ ), CFA + LLLT ( $34,62 \pm 39,32$ ) e CFA + LEDT ( $11,99 \pm 2,75$ ) (Figura 22, painel C).

(A)



(B)



(C)

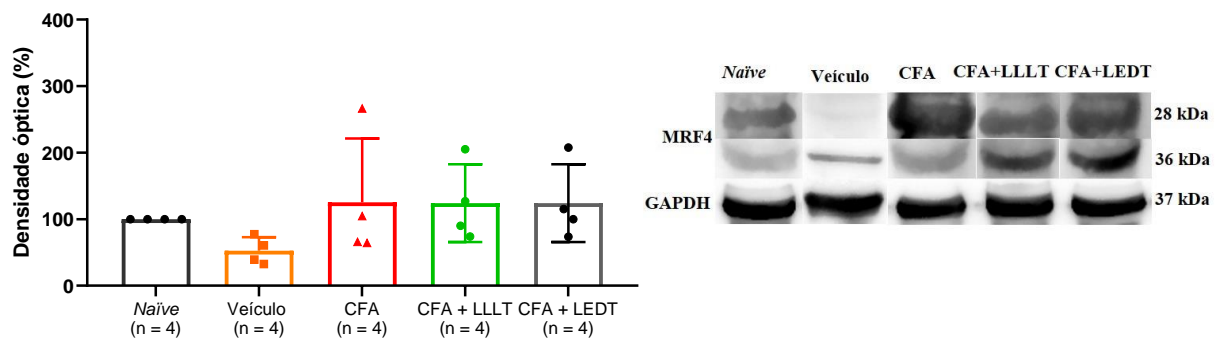
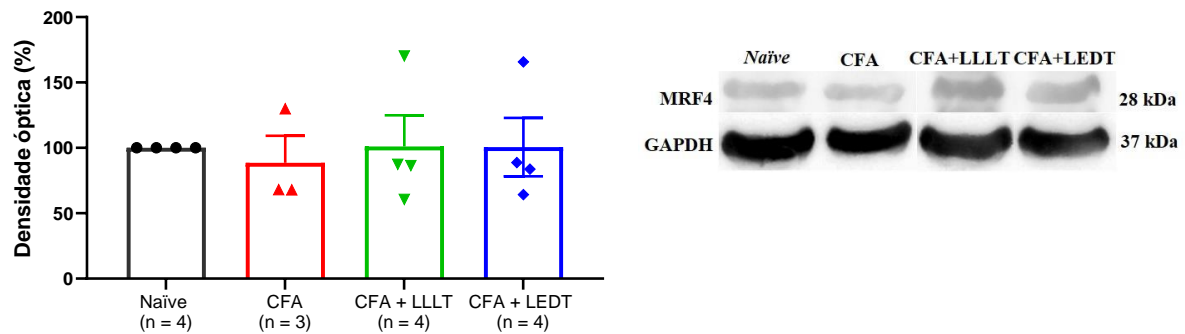


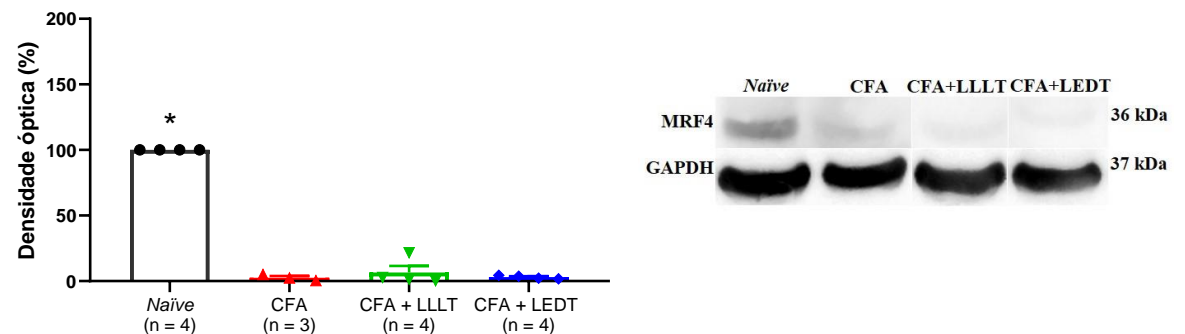
Figura 21 – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína MRF4 no músculo GC direito (ipsilateral). O painel (A) refere-se à quantificação da expressão proteica de MRF4, com peso molecular de 28 kDa; o painel (B) refere-se à quantificação da expressão proteica de MRF4, com peso molecular de 36 kDa; o painel (C) refere-se à somatória da expressão proteica de ambos os pesos moleculares (28 e 36 kDa). Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni.



(A)



(B)



(C)

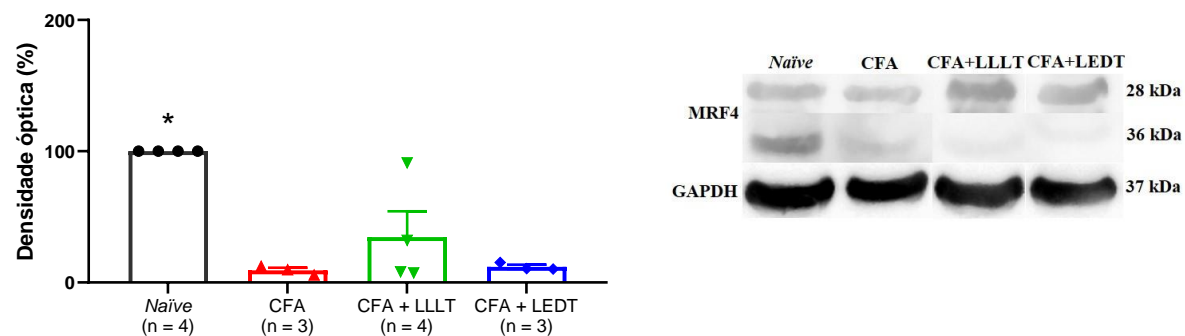


Figura 22 – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína MRF4 no músculo GC esquerdo (contralateral). O painel (A) refere-se à quantificação da expressão proteica de MRF4, com peso molecular de 28 kDa; o painel (B) refere-se à quantificação da expressão proteica de MRF4, com peso molecular de 36 kDa; o painel (C) refere-se à somatória da expressão proteica de ambos os pesos moleculares (28 e 36 kDa). Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. O símbolo (\*) representa o valor de  $p < 0,05$  na comparação do grupo *Naïve* aos demais grupos.

#### 4.5.5 Quantificação proteica da cadeia pesada de miosina embrionária (MyHC-e) após a injeção de CFA e o tratamento com LLLT e LEDT

Na análise da proteína MyHC-e (240 kDa) não foram observadas alterações no padrão de expressão proteica entre os grupos experimentais para o lado ipsilateral (Figura 23), isto significa que todos os grupos demonstraram apenas expressão basal.

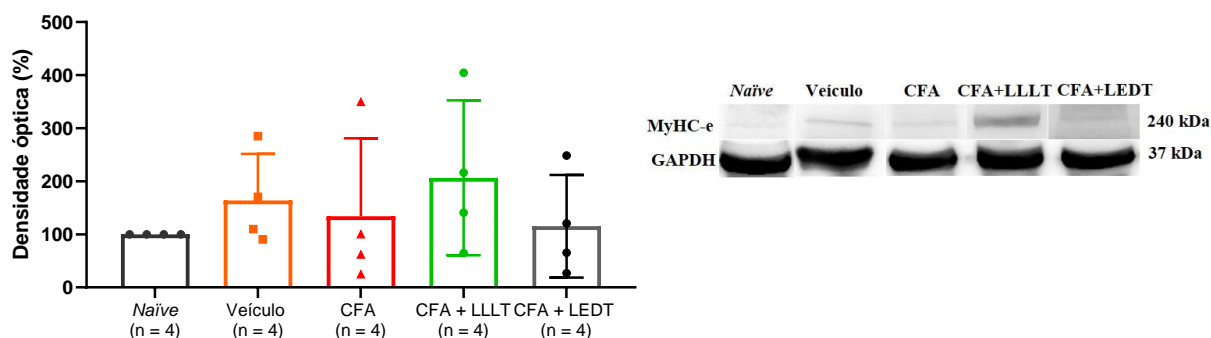


Figura 23 – Gráfico de barras representando a porcentagem da densidade óptica (%) referente à expressão proteica da proteína MyHC-e no músculo GC direito (ipsilateral). Os resultados apresentam a média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni.

## 5 DISCUSSÃO

A dor muscular é uma das principais causas de deficiência locomotora e é responsável por 29% de absenteísmo no trabalho [30]. Distúrbios musculares são encontrados rotineiramente em centros de reabilitação e representam 60% de todas as doenças [126]. Qualquer tipo de lesão muscular (contusão, por exemplo) pode levar a um mecanismo inflamatório, subseqüentemente induzindo dor local ou irradiada [30].

Apesar de atualmente a PBMT estar sendo utilizada abundantemente como terapia complementar [127-130], ainda existem lacunas quanto aos parâmetros da PBMT para melhorar diferentes tipos de dores e inflamações, especialmente a miosite, inflamação específica no músculo, que pode ocasionar a dor muscular.

Este trabalho buscou um protocolo dos parâmetros ideais para o tratamento da miosite pela injeção de CFA, por meio da PBMT, que além de não invasiva também não apresenta efeitos colaterais descritos na literatura. Dentro da PBMT, dispomos principalmente do LLLT e do LEDT, dois tipos de fonte de luz muito utilizados tanto na pesquisa básica como na clínica voltados ao tratamento de lesões musculoesqueléticas [131]. Sendo assim, nossos objetivos foram observar se a PBMT, com LLLT e LEDT, era capaz de interferir na resposta nociceptiva, edematogênica, inflamatória e regenerativa nos músculos dos animais induzidos à miosite e qual tipo de fonte de luz poderia apresentar melhores resultados.

Inicialmente, foi comprovado que a injeção de CFA é capaz de induzir processo inflamatório extenso e degenerativo no músculo GC dos animais, sendo caracterizado como miosite com subseqüente dor muscular. Isto pois os animais submetidos à injeção de CFA apresentaram hipernocicepção nos testes comportamentais, edema muscular, ampla área de infiltrado inflamatório nas análises histológicas realizadas e aumento da expressão proteica de marcadores da regeneração muscular, como Pax7, MyHC-e, FGF-6 e TGF- $\beta$ 1.

Com o modelo de miosite validado nos grupos que receberam a injeção de CFA, o objetivo seguinte foi avaliar o efeito da PBMT neste modelo, utilizando-se de duas fontes de luz: LLLT e LEDT. Os grupos submetidos ao LLLT e ao LEDT apresentaram resultados semelhantes na hipernocicepção dos animais no modelo de miosite, pois ambos os tipos de tratamentos promoveram parcial aumento do limiar nociceptivo dos animais. Ou seja, o protocolo de tratamento com a dose de 3 J utilizada tanto para

LLLT, quanto para LEDT foram capazes de reduzir significativamente a resposta do teste de alodinia tátil, porém, não houve diferença nas respostas ao estímulo mecânico e térmico dos animais tratados dentro do protocolo utilizado [35].

As fibras que conduzem a resposta nociceptiva podem ser principalmente do tipo A-delta, de condução rápida, ou fibras C, de condução lenta. Sendo assim, sabe-se que a resposta de alodinia tátil está fisiologicamente relacionada às fibras A-delta, que são fibras mais superficiais e a resposta nociceptiva dos testes comportamentais de hiperalgesia térmica e mecânica, estão relacionadas com as fibras C, que são fibras mais profundas.

Por isso, nossa hipótese para estes resultados comportamentais são de que devido a esta diferença inicial de estimulação de uma fibra ou outra, acreditamos que possa justificar a falta de efeito na resposta ao estímulo mecânico e térmico observado. No entanto, para comprovar esta hipótese, outros ensaios experimentais como eletrofisiologia necessitam ser conduzidos, além da alteração do protocolo utilizado para o tratamento.

Nossos resultados são consistentes com estudos que mostram o uso de alta irradiância para alívio rápido da dor e baixa irradiância para alívio prolongado da dor [132]. Outro estudo, demonstrou o efeito da PBMT em animais submetidos ao modelo de osteoartrite de joelho, com a diminuição do limiar nociceptivo ao estímulo tátil [133]. Além disso, nosso grupo também demonstrou efeito benéfico da PBMT na melhora do limiar nociceptivo em modelo de neuralgia do trigêmeo [100, 101], neuropatia crônica [95] e mais recentemente, a mesma terapia demonstrou melhorar o comportamento nociceptivo em modelos de neuropatia diabética [103, 134].

Além do mais, estudos conduzidos em pacientes demonstraram que a combinação de comprimentos de onda LLLT pulsado (905 nm) com LEDT em dois comprimentos de onda diferentes (640 nm e 875 nm) foram eficazes na redução da dor e na melhora dos componentes físicos em pacientes com dor no joelho [80]. Outro estudo, também em pacientes, verificou que o tratamento com LLLT (830 nm) foi capaz de induzir analgesia nos músculos mastigatórios dos participantes que apresentavam disfunção temporomandibular (DTM) [135].

Um estudo realizado por Neves *et al.* (2018) demonstrou a falta de resposta ao estímulo térmico após injeção de carragenina e o tratamento com PBMT em animais

[136]. Outro estudo realizado por Janzadeh *et al.* (2020) também demonstrou a falta de efeito ao estímulo mecânico, após o tratamento com a PBMT em animais com lesão medular [137].

Um dos nossos objetivos foi mensurar o edema no músculo GC e observar o possível efeito da PBMT neste sinal inflamatório. Nossos resultados mostraram que os dois tipos de fonte de luz (LLLT ou LEDT) foram igualmente eficazes na redução do edema induzido pela miosite. Em uma revisão sistemática, realizado por Silva *et al.* (2018) mostrou que a PBMT, utilizando diferentes tipos de fontes de luz, foi capaz de reduzir os efeitos patológicos locais, dentre eles o edema [138]. Além disso, um recente estudo verificou que a PBMT foi eficaz em reduzir a nocicepção e edema de animais com síndrome de dor regional complexa induzida por isquemia-reperfusão na pata traseira direita [139].

A resposta inflamatória induzida pela injeção de CFA foi comprovada também com os ensaios histológicos. Os grupos *Naïve* e Veículo apresentaram morfologia padrão do músculo esquelético, com fibras bem estruturadas e número fisiológico de núcleos periféricos. No entanto, o grupo CFA apresentou características morfológicas inflamatórias, com vasta área de infiltrado inflamatório, caracterizado pela presença de leucócitos e macrófagos, aumento do número de fibras musculares com núcleo centralizado e aumento da área das fibras com núcleo centralizado. Portanto, mostramos que nosso modelo foi eficaz em mimetizar a miosite em animais com um padrão histológico semelhante ao observado pelo nosso trabalho anterior [33] no músculo gastrocnêmio. Outros trabalhos também demonstraram êxito em induzir inflamação no músculo masseter pela injeção de CFA [140-142].

Com a PBMT, tanto o grupo que recebeu o LLLT quanto o que recebeu o LEDT apresentaram diminuição da inflamação induzida pela injeção de CFA, já que a área de infiltrado inflamatório nos animais dos grupos tratados é menor do que no grupo CFA, bem como é menor a quantidade de fibras com núcleo centralizado e menor a área das fibras com núcleo centralizado, evidenciando que a PBMT promoveu controle da extensão da inflamação e efeito protetor contra a injeção de CFA. Com isso, podemos afirmar que os parâmetros utilizados em ambos os tratamentos puderam induzir melhora na resposta alodínica e edematogênica em nosso modelo experimental. Estudos semelhantes observaram que a PBMT foi eficaz na redução da inflamação pela

melhor organização das fibras musculares, redução da necrose celular e hemorragia no local lesionado [143, 144].

Além disso, estudos têm mostrado que a PBMT foi capaz de reduzir o edema do músculo esquelético [145], levando a uma redução significativa nos marcadores inflamatórios [146], além de acelerar o processo de regeneração muscular [147]. Ainda, se tratando do músculo, estudos demonstraram que a PBMT pode aumentar a massa muscular adquirida após o treinamento, diminuir a inflamação e o estresse oxidativo em biópsias musculares [92, 148-150].

Vieira *et al.* (2018) demonstrou que a PBMT por meio do laser 904 nm (GaAs) promoveu modificação molecular no músculo gastrocnêmio do camundongo submetidos à mionecrose por veneno de serpente do gênero *Bothrops jararacussu*. Após o tratamento, foi observado o aparecimento de numerosas células nucleadas centralmente no músculo, característica da regeneração da miofibra, formação aumentada de mioblastos, com regeneração mais rápida em relação ao músculo não irradiado [151]. Em um estudo subsequente, os autores observaram que o LLLT levou à redução da área de infiltrado inflamatório, sugerindo efeito protetor da terapia utilizada no músculo envenenado [120].

Dourado *et al.* (2017) também observaram que a PBMT quando aplicada em camundongos submetidos à injeção do veneno de *Bothrops moojeni* no músculo gastrocnêmio, levou ao aumento de células com perfil regenerativo nucleadas centralmente, bem desenvolvidas e número aumentado de vasos sanguíneos recém-formados quando comparados aos músculos não irradiados [152]. No trabalho de revisão de Silva *et al.* (2018) foi demonstrado que a PBMT é uma ferramenta promissora para o tratamento local dos efeitos causados pela picada de serpente, reduzindo o edema local, hiperalgesia, influxo leucocitário e mionecrose, acelerando a regeneração tecidual relacionada à miotoxicidade [153].

No intuito de caracterizar o perfil do infiltrado inflamatório, realizamos a imuno-histoquímica do músculo GC para avaliarmos a incidência de macrófagos, tanto com anticorpo contra macrófagos dos dois fenótipos M1+M2 (CD68), que englobam as duas isoformas, de característica pró-inflamatória e anti-inflamatória, respectivamente, quanto anticorpo contra apenas macrófago anti-inflamatório do tipo M2 (CD206). Ao quantificamos os macrófagos, não observamos alteração na marcação de M1+M2 ou

M2 após tratamento com PBMT. Esperávamos encontrar número aumentado de macrófagos que englobam os dois fenótipos M1+M2 e apenas o fenótipo anti-inflamatório M2 após o tratamento com a terapia, pois, para desencadear a resolução da inflamação no músculo esquelético os macrófagos pró-inflamatórios (M1) passam a ser anti-inflamatórios (M2), dando sequência ao processo de regeneração muscular [154]. Contrariamente aos resultados obtidos, a literatura mostra a capacidade da PBMT em favorecer a polarização de macrófagos durante a inflamação do tecido [90, 155]. Ademais, outros autores mostraram que as diferentes populações de macrófagos podem ser moduladas pelo tratamento de PBMT durante a regeneração muscular, para fluírem contra a inflamação, com diminuição de macrófagos M1 e aumento de macrófagos M2 no músculo [156] e em outros tecidos por expressão de marcadores anti-inflamatórios [86, 157-159].

As interações do músculo com as células do sistema imune após lesão muscular, e particularmente a atividade dos macrófagos, são reconhecidas como críticas para a regeneração bem-sucedida [160]. Nesse contexto, Shang *et al.* (2020) mostraram a importância dos macrófagos durante a regeneração muscular [161]. No estudo de Zhang *et al.* (2020) o aumento dos níveis de lactato durante a isquemia resgatou a polarização de macrófagos e melhorou a reperfusão e regeneração muscular [162].

A regeneração muscular é iniciada com a ativação de células satélites, que entram no ciclo celular para darem início ao processo proliferativo e se diferenciarem em mioblastos. Esta etapa inicial é caracterizada pelo aumento da regulação de Pax7 [54, 163-166]. Em nosso trabalho, duas bandas para a expressão proteica de Pax7 foram analisadas, a banda de 36 kDa, relacionada a forma clivada e inativa pela Caspase 3 [57] e a banda de 50 kDa, que está relacionada à isoforma fosforilada e ativa de Pax7 pela CK2 [58].

A forma inativa de Pax7 foi expressa em quantidade basal em todos os grupos analisados, sem diferença estatística. No entanto, a forma ativa de Pax7 no grupo CFA foi aumentada em relação aos grupos *Naïve* e Veículo. Ao analisarmos os grupos que receberam o tratamento de LLLT ou LEDT observamos que não houve diferença no padrão de expressão em relação ao grupo CFA, pois a expressão desse fator de transcrição continuou aumentada mesmo após o tratamento.

Supúnhamos que nos grupos tratados com a PBMT a regulação de Pax7 fosse diminuída na banda de 50 kDa (isoforma ativa) e aumentada na banda de 36 kDa (isoforma inativa), pois assim, teríamos maior atividade da Caspase 3 clivando Pax7 e o processo de regeneração estaria evoluindo para as fases seguintes, como mostra a literatura [165, 167-169]. Em estudo de Silva *et al.* (2019) a superexpressão do miR-29c no músculo tibial anterior pôde aumentar a proliferação e diferenciação muscular evidenciada pelo aumento núcleos positivos para Pax7 [170]. Lin *et al.* (2020) mostrou em cultura de células satélites a modulação bidirecional de Pax7 após aplicação de PBMT [171]. Além disso, Vieira *et al.* (2021) demonstraram resultado similar ao nosso ao analisar a expressão gênica de *Pax7* em diferentes tempos após injeção de veneno, pois não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos tratados e não tratados com PBMT, apenas expressão basal desse fator de transcrição [120].

Alguns estudos mostram o processo de regeneração em andamento via regulação positiva ou negativa de Pax7. Avin *et al.* (2016) observaram menor regulação de Pax7 no modelo de doença renal crônica associada ao estresse oxidativo e altos níveis de miostatina nos animais, que podem comprometer a função do músculo esquelético [172].

Estudos que descrevem a regeneração muscular mostram a regulação de Pax7 em fases iniciais, tendo sua importância tanto para manter as células em constante autorrenovação (manter o pool de células satélites), como sendo um dos fatores que dão início ao processo de regeneração após lesão do músculo [173-176].

Durante o processo de regeneração muscular há fatores de crescimento e citocinas que participam das diferentes etapas para auxiliá-lo, como por exemplo, FGF-6, que atua em altas concentrações no início do processo, estimulando a entrada de células satélites no ciclo celular, impulsionando a proliferação e ao final do processo, em níveis mais baixos, ativam as vias de diferenciação muscular [62, 68, 163, 177]. No presente trabalho, a expressão proteica de FGF-6 no grupo CFA foi aumentada em relação aos grupos *Naïve* e Veículo. Nos grupos tratados (CFA+LLLT e CFA+LEDT), o padrão de expressão da proteína em questão foi semelhante ao do grupo CFA.

O FGF-6 apresenta função dupla durante a miogênese, dependendo de qual receptor FGF-6 é ativado. Durante os estágios iniciais de regeneração, altas concentrações de FGF-6 promovem a proliferação do precursor miogênico através do



FGFR1. Em estágios posteriores, concentrações mais baixas de FGF-6 ativam as vias de diferenciação por meio do FGFR4 [68, 178, 179]. Por isso, esperávamos que com efeito do tratamento os animais dos grupos CFA+LLLT e CFA+LEDT estivessem em estágio mais avançado da regeneração, com baixos níveis da atividade de FGF-6. Para confirmarmos a hipótese de que os grupos que receberam a injeção de CFA encontram-se em estágios iniciais da regeneração muscular há a necessidade de experimentos mais específicos relacionados aos receptores FGFR1 e FGFR4, que atuam em diferentes momentos do processo de regeneração muscular.

Hannon *et al.* (1996) examinaram níveis de FGF em células MM14, uma linhagem de células satélites de músculo esquelético, e observaram que as células em proliferação expressaram FGF-1, FGF-2, FGF-6 e FGF-7, enquanto as células diferenciadas expressaram FGF-5 e FGF-7, e redução da expressão de FGF-6 [180]. Em outro trabalho os autores observaram que o FGF-6 injetado no músculo tibial por três semanas em altas concentrações após lesão nervosa aumentou a proliferação de células mioblásticas, sugerindo que a proliferação celular aumentada é mediada pelas vias de sinalização de FGF6-FGFR1 que aumentam a expressão de ciclina D1. Ainda, baixas concentrações de FGF-6 aumentaram significativamente a expressão de MyoD e miogenina, bem como de FGFR4, indicando que a sinalização de FGF6-FGFR4 promove a diferenciação de mioblastos, aumentando a expressão de fatores de transcrição específicos do músculo [68].

Pizette *et al.* (1996) investigaram o papel exógeno de FGF-6 em linhagem celular de mioblastos C2 de camundongo e sugeriram que as diferentes concentrações intramusculares de FGF-6 podem influenciar os processos de proliferação e diferenciação que ocorrem durante o desenvolvimento [181]. Layegh *et al.* (2020) ao comparar fibroblastos dérmicos primários de doadores normais e de diabéticos tipo II sob o tratamento de PBMT observaram o potencial efeito modulatório da terapia sob o FGF-6 [182].

Além do FGF-6, o TGF- $\beta$ 1 é uma importante citocina sinalizadora da regeneração muscular. Durante a remodelação do tecido, TGF- $\beta$ 1 atua na diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, os quais produzem uma MEC inicial de colágeno tipo I e tipo III. Entretanto, a persistência de proliferação excessiva de fibroblastos e miofibroblastos, acompanhado por níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 em

estágios tardios da regeneração, pode levar ao acúmulo de MEC e enrijecimento do tecido, que pode levar a diminuição da capacidade dos mioblastos de regenerar o músculo, havendo maior deposição de tecido cicatricial e provável perda da função muscular [76, 183]

Em nossos resultados da expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 no músculo GC, observamos maior regulação dessa proteína no grupo CFA em relação ao grupo Veículo. Nos grupos injetados com CFA e tratados com PBMT, observamos que para o LLLT houve maior expressão da proteína analisada em relação ao grupo Veículo. Já no grupo tratado com LEDT houve menor expressão da proteína com relação aos grupos CFA e CFA+LLLT. Além do mais, a regulação de TGF- $\beta$ 1 foi menor no grupo Veículo comparado ao grupo *Naïve*.

Neste sentido, sugerimos que o tratamento com LEDT foi capaz de controlar com mais êxito a fibrose no músculo causada pela injeção de CFA em comparação ao grupo CFA+LLLT, já que o grupo tratado com LEDT apresentou menores níveis de TGF- $\beta$ 1 e, conseqüentemente, menor deposição de MEC e fibrose. Para resultados mais precisos, confirmando nossa hipótese, seriam importantes mais experimentos que avaliassem o processo fibrótico no músculo, como por exemplo a análise de colágeno [184], fibronectina [185] e proteoglicanos [79].

Liu *et al.* (2017) mostraram que após a depleção de macrófagos em modelo de contusão muscular, os níveis de TGF- $\beta$ 1 estavam aumentados nos estágios tardios da regeneração muscular, comprometendo este processo [186]. Em modelo experimental de esclerose lateral amiotrófica (ELA) em camundongos, foram apresentadas evidências de fibrose no músculo esquelético, que se correlaciona com a sinalização aumentada de TGF- $\beta$ 1 [77]. Outro estudo relacionado a Síndrome de Marfan, utilizou camundongos deficientes em fibrilina-1 e foi observado que o aumento da atividade de TGF- $\beta$ 1 leva à falha da regeneração muscular [74]. Lefaucheur *et al.* (1995) constataram, ao neutralizarem TGF- $\beta$ 1 em modelo de lesão por desnervação-desvascularização do extensor longo dos dedos (EDL) em camundongos, aumento do número de pequenas miofibras em regeneração, sendo a TGF- $\beta$ 1 inibitória da proliferação de mioblastos [187].

No trabalho de Kim *et al.* (2020) foi evidenciada a formação de tecido cicatricial causada pela atividade pró-fibrótica de fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ 1, que é

uma causa potencial de atraso na recuperação da força após lesão muscular induzida pelo exercício [78]. Sassoli *et al.* (2016) e Chang *et al.* (2020) apontam a PBMT como um tratamento antifibrótico em tecidos via cultura de fibroblastos [188, 189]. Mesquita-Ferrari *et al.* (2011) observaram que após o tratamento de PBMT em modelo de criolesão muscular, os níveis gênicos de TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$  diminuíram em relação ao grupo sem tratamento, 7 dias após a lesão [190].

Após os processos de proliferação e diferenciação em mioblastos mediados por Pax7, FGF-6 e TGF- $\beta$ , a regeneração muscular é seguida pela diferenciação, onde estão presentes alguns outros marcadores, como o MRF4, que tem papel fundamental na diferenciação do músculo [191, 192]. Com relação a expressão da proteína MRF4, encontramos duas bandas aparentes para análise, que são descritas no *datasheet* do anticorpo utilizado, sendo elas de 28 kDa e 36 kDa. Não observamos alteração significativa no padrão de expressão da proteína entre os grupos. Por isso, sugerimos que a PBMT na dose utilizada não foi eficaz em acelerar o processo de regeneração para fases terminais, já que esperávamos maior expressão de MRF4 para que isso acontecesse, como é descrito por diferentes autores [193, 194].

Lima *et al.* (2021) e Hernandez-Hernandez *et al.* (2017) explicita a importância dos fatores reguladores miogênicos para determinação miogênica, incluindo o MRF4 [195, 196]. Outros autores descreveram os papéis dos MRFs durante a regeneração muscular, apontando que MRF4, juntamente com a miogenina, atuam em fases tardias da miogênese, permitindo a formação e maturação dos miotubos [193, 194, 197].

No trabalho de Zhou *et al.* (2018), com intuito de padronizar o modelo de fibrose muscular induzida por radiação, avaliaram a expressão gênica de MRF4 durante 1, 2, 4 e 8 semanas após exposição à radiação. Com isso, observaram que nas semanas iniciais não houve diferença dessa expressão entre os grupos, mas após 4 e 8 semanas da indução do modelo, houve maior regulação de MRF4 nos grupos expostos à radiação em relação aos grupos controles. Além disso, o modelo de fibrose muscular foi confirmado pelo aumento da expressão de TGF- $\beta$ 1 no músculo reto femoral de ratos [198].

Em fases finais da regeneração muscular, a reexpressão transitória de genes que codificam a miosina embrionária *Myh3* e a miosina neonatal *Myh8* é típica para lesão muscular e diminui à medida que a maturação das miofibras regeneradas

progride [199]. Assim, com o processo de regeneração muscular completo, há expressão de MHC adulta. Essas características evidenciam fases terminais do processo de regeneração muscular [48, 200-202].

Dessa forma, as análises da expressão de MyHC-e, isoforma embrionária da cadeia pesada de miosina, não mostraram diferenças estatísticas no padrão de expressão entre os grupos. Friedmann-Bette *et al.* (2018) investigaram os efeitos do treinamento de força em atletas após reconstrução do ligamento cruzado anterior (LCA), com isso, o grupo que recebeu treinamento de “*leg press*”, guiado por computador com sobrecarga excêntrica, apresentava número significativamente maior de miofibras expressando MyHC-n e MHC I do que no grupo com treinamento de *leg press* concêntrico/excêntrico convencional, mas ainda assim, havia sinais moderados de ativação celular miogênica [203].

O tratamento com  $\beta$ -escina em modelo experimental de lesão por cardiotoxina demonstrou que a droga promove a regeneração muscular, pois houve redução da infiltração de macrófagos nos músculos lesionados e aumento da população de macrófagos M2, outro resultado que comprova esse achado foram os níveis de transcrição de *Myh3* (embrionária) e *Myh8* (neonatal) mais baixos tanto nos dias 3 e 14 após a indução da lesão em comparação com animais não tratados no músculo EDL [204].

Em modelo de regeneração muscular induzido por desnervação e esmagamento de tendões, Zimowska *et al.* (2017) demonstraram maior atividade de MyHC-e em estágios iniciais da regeneração muscular tanto no músculo sóleo como no EDL, porém, a expressão foi marcadamente prolongada no sóleo em comparação com o EDL [205]. De Lima Rodrigues *et al.* (2018) observaram que a PBMT, em diferentes protocolos de irradiação, pôde modular a expressão das diferentes isoformas de MyHC durante o processo de reparo de lesão muscular induzido pela criolesão no músculo tibial anterior [206]. Por outro lado, Macedo *et al.* (2020) averiguaram que a PBMT em conjunto ao treino de resistência aumentou o desempenho dos animais no treinamento resistido e a expressão de genes associados ao ganho de massa muscular em relação ao grupo apenas exercitado (sem PBMT), porém, nos parâmetros utilizados, tanto de treino quanto de PBMT, não foi possível observar alterações nos níveis gênicos de MHC [207].

Nesse caso, os resultados de WB, analisando a expressão de Pax7, FGF-6, TGF- $\beta$ 1, MRF4 e MyHC-e mostram que não foi possível estimular de maneira significativa o processo regenerativo no músculo GC no modelo de miosite pela injeção de CFA sob o tratamento de PBMT, no protocolo utilizado. Isso diverge do que é sugerido na literatura, como no trabalho de revisão de Shepherd *et al.* (2022) que mostram em diversos estudos a capacidade da PBMT em modular os MRFs em modelos experimentais de lesão muscular [208].

Tendo em vista os resultados apresentados, a PBMT pôde melhorar o limiar nociceptivo dos animais com miosite no teste de alodínia tátil, diminuir o edema muscular, controlar a extensão da inflamação protegendo o músculo de um processo inflamatório exacerbado como observado no grupo não tratado. Ao compararmos os tipos tratamento (LLLT e LEDT), não identificamos grandes diferenças em seus efeitos, as principais foram que o LLLT pôde controlar com mais precisão a extensão da inflamação no músculo em relação ao tratamento com LEDT. Já na análise da expressão proteica de TFG- $\beta$ 1, o tratamento com LEDT foi mais efetivo em controlar o processo fibrótico no músculo.

Por outro lado, não observamos efeito do tratamento nos testes de hiperalgesia mecânica e térmica, nas análises das quantificações de macrófagos, tampouco no processo de regeneração muscular. Portanto, para que a PBMT, tanto com LLLT e LEDT apresente resultados mais claros, concisos e consistentes para estes pontos comentados, sugerimos novos parâmetros para o tratamento, que é um dos maiores desafios atualmente. A PBMT tem a capacidade de ser analgésica, anti-inflamatória e regenerativa [209], mas para ter sucesso nesses processos, é preciso encontrar os parâmetros ideais para a lesão, dor ou processo inflamatório a ser tratado.

Neste sentido, sugerimos que o comprimento de onda para o tratamento no músculo esquelético, especificamente, seja na faixa de 800-900nm, pois atingiria com maior precisão o tecido em questão, isto pois no tratamento com LLLT o comprimento de onda utilizado é de 660 nm e ao decorrer do trabalho percebemos que este seria para estruturas mais superficiais como camadas derme e epiderme [210].

Sugerimos também que a quantidade de sessões do tratamento deva ser alterada, mantendo apenas o local e os pontos de aplicação. Provavelmente 5 sessões ainda não parecem ser suficientes, tendo em vista os resultados que obtivemos. Pelas

experiências do nosso laboratório, trabalhos na literatura e os achados com este trabalho, sugerimos que o total de 10 sessões seja o ideal para resultados positivos na miosite.

Além do que, a literatura descreve que o processo regenerativo leva um pouco mais de tempo do que estamos trabalhando atualmente. Este tem em média de 10-21 dias para ser completo e finalizado [61, 211, 212]. Por isso acreditamos que, se o tempo do tratamento fosse mais prolongado, poderíamos observar resultados promissores, já que o processo regenerativo no músculo se sucede em maior tempo do que estávamos trabalhando com a terapia.

A chave de todo o tratamento que utilize a PBMT, isolada ou em conjunto com outro tipo de terapia, é a escolha ideal dos parâmetros a serem utilizados. Por isso, é importante que pesquisas sobre a PBMT no modelo de miosite continuem a ser realizadas, já que esta terapia pode ser muito bem utilizada, por exemplo, na clínica médica, para lesões musculares em atletas, dores musculares em jovens, adultos e idosos.

## **6 CONCLUSÃO**

De maneira geral, a PBMT aplicada por meio de LLLT ou LEDT apresentou indícios do efeito benéfico na miosite experimental induzida pela injeção de CFA, pois foram eficazes em melhorar parcialmente a hipernocicepção dos animais no teste de alodínia tátil, diminuir o edema dos animais e controlar a extensão da inflamação no músculo bem como a fibrose desenvolvida.

## **7 ATIVIDADES ACADÊMICAS**

**7.1** Disciplinas e Obrigações do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas nos segundos semestres dos anos de 2019 e 2020;

**7.2** Participação da XXXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental com apresentação do trabalho "Photobiomodulation as treatment for inflammation and muscle pain", publicado nos anais, página 58, volume 1, São Paulo, de 9 a 13 de setembro;

**7.3** Organização de evento na Comissão Socioeconômico da XII Jornada de Anatomia da Universidade de São Paulo- Estudo do Sistema Digestório durante o ano de 2019 para realização do evento em 2020;

**7.4** Monitora da aula prática intitulada: Vascularização das Vísceras do Sistema Digestório na XII Jornada de Anatomia da Universidade de São Paulo- Estudo do Sistema Digestório em janeiro de 2020;

**7.5** Monitora da aula prática intitulada: Cavidade oral, processos de mastigação e deglutição na XII Jornada de Anatomia da Universidade de São Paulo- Estudo do Sistema Digestório em janeiro de 2020;

**7.6** Participação no Estágio PAE, na disciplina BMA128- Anatomia Geral- 1º/2020, como voluntário supervisionado pela Prof. Dra. Marucia Chacur;

**7.7** Participação no Estágio PAE, na disciplina BMA129- Anatomia do Aparelho Locomotor- 2º/2020, como voluntário supervisionado pela Prof. Dra. Elen Haruka Miyabara;

**7.8** Publicação do trabalho "Photobiomodulation reduces nociception and edema in a CFA-induced muscle pain model: effects of LLLT and LEDT", no periódico Photochemical and Photobiological Sciences, páginas 1392-1401, volume 19, Reino Unido no ano de 2020 (ANEXO A);

**7.9** Participação no Estágio PAE, na disciplina BMA125D- Anatomia Humana- 1º/2021, como voluntário supervisionado pela Prof. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves;

**7.10** Participação da com apresentação do trabalho "Photobiomodulation exerts anti-inflammatory and antinociceptive effects in CFA-induced myositis", realizada online, no período de 8 a 11 de setembro de 2021;



**7.11** Participação como coautora do trabalho apresentado na XXXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental intitulado "Participação da microglia e de receptores Nk1 na mediação central da hiperalgesia induzida pelo veneno de serpentes Bothrops jararaca: possível envolvimento das plaquetas", realizada online, no período de 8 a 11 de setembro de 2021;

**7.12** Realização do curso "Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão: Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório" com carga horária de 60 horas entre julho e setembro de 2021;

**7.13** Participação do I Simpósio Online de Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana da Faculdade Alvorada Saúde como palestrante do tema "Dor muscular, inflamação e fotobiomodulação" em fevereiro de 2021;

**7.14** Participação da XLIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento com apresentação do trabalho "Effect of photobiomodulation on inflammation and nociception in rats with complete Freund's adjuvant (CFA)-induced myositis", realizada online, no período de 5 a 9 de outubro de 2021;

**7.15** Participação do II Simpósio da Pós-graduação em Biologia de Sistemas com apresentação do trabalho " Exploring LASER and LED as potential therapies for cfa-induced myositis: pain and inflammation", realizada online, no período de 5 a 9 de outubro de 2021;

**7.16** Publicação como co-autora do trabalho "Ultrastructural and Molecular Development of the Myotendinous Junction Triggered by Stretching Prior to Resistance Exercise", no periódico Microscopy and Microanalysis, páginas 1-6, volume 19, Reino Unido no ano de 2022 (ANEXO B).

**7.17** Submissão de resumo como co-autora do trabalho "Could Photobiomodulation Therapy treat, or even prevent, Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathic Pain?" para o congresso mundial da International Association for the Study of Pain (IASP), "IASP World Congress on Pain", que ocorrerá em Toronto, Canadá, entre os dias 19 e 23 de setembro de 2022.

## REFERÊNCIAS

1. Raja, S.N., et al., *The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises*. Pain, 2020.
2. Machado, A.M.H., L.M., *Neuroanatomia Funcional*. 3ª edição ed. 2014, São Paulo: Atheneu. 344.
3. Millan, M.J., *Descending control of pain*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(6): p. 355-474.
4. Aydede, M.S., A., *Recently introduced definition of "nociplastic pain" by the International Association for the Study of Pain needs better formulation*. Pain, 2018. **159**(6): p. 1176-1177.
5. Heinricher, M.M., *Pain Modulation and the Transition from Acute to Chronic Pain*. Adv Exp Med Biol, 2016. **904**: p. 105-15.
6. Fillingim, R.B.L., J. D; Baron, R.; Edwards, R. R., *Assessment of Chronic Pain: Domains, Methods, and Mechanisms*. J Pain, 2016. **17**(9 Suppl): p. T10-20.
7. Treede, R.D., et al., *Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11)*. Pain, 2019. **160**(1): p. 19-27.
8. Baliki, M.N.A., A. V., *Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection*. Neuron, 2015. **87**(3): p. 474-91.
9. Tracey, W.D., Jr., *Nociception*. Curr Biol, 2017. **27**(4): p. R129-R133.
10. Webster, K.E., *Somaesthetic pathways*. Br Med Bull, 1977. **33**(2): p. 113-20.
11. Piotrowski, W. and J.C. Foreman, *Some effects of calcitonin gene-related peptide in human skin and on histamine release*. Br J Dermatol, 1986. **114**(1): p. 37-46.
12. Rocha, A.P., et al., *Pain: current aspects on peripheral and central sensitization*. Rev Bras Anesthesiol, 2007. **57**(1): p. 94-105.
13. Sneddon, L.U., *Comparative Physiology of Nociception and Pain*. Physiology (Bethesda), 2018. **33**(1): p. 63-73.
14. Loeser, J.D.T., R. D., *The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology*. Pain, 2008. **137**(3): p. 473-7.
15. Walker, S.M., et al., *Primary and secondary hyperalgesia can be differentiated by postnatal age and ERK activation in the spinal dorsal horn of the rat pup*. Pain, 2007. **128**(1-2): p. 157-68.
16. Abdelhamid, R.E.S., K. A., *ASICs Mediate Pain and Inflammation in Musculoskeletal Diseases*. Physiology, 2015. **30**(6): p. 449-59.
17. Perrot, S., et al., *The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary musculoskeletal pain*. Pain, 2019. **160**(1): p. 77-82.
18. Mense, S.S., D.G; Russell, J., *Dor muscular: natureza, diagnóstico e tratamento* Editora Manole. Ltda ed. 2008.
19. Mense, S. and R.D. Gerwin, *Muscle Pain: Understanding the Mechanisms*. Vol. 1. 2010, Berlin Heidelberg: Springer. 323.
20. Henschke, N.K., S. J; Maher, C. G., *The epidemiology and economic consequences of pain*. Mayo Clin Proc, 2015. **90**(1): p. 139-47.
21. Teixeira, M.J., et al., *Epidemiologia clínica da dor músculo-esquelética*. Revista de Medicina, 2001. **80**(spe1): p. 1-21.
22. Conecta, I. *Má postura é principal causa de dores nas costas e musculares*. 2017 [cited 2019 26 de fevereiro].

23. Fernandes, T.L.P., A; Hernandez, A. J., *Muscle Injury - Physiopathology, Diagnosis, Treatment and Clinical Presentation*. Revista Brasileira de Ortopedia, 2011. **46**(3): p. 247-55.
24. Sogaard, K.S., G., *Physical Activity as Cause and Cure of Muscular Pain: Evidence of Underlying Mechanisms*. Exerc Sport Sci Rev, 2017. **45**(3): p. 136-145.
25. Talotta, R., et al., *One year in review 2017: fibromyalgia*. Clin Exp Rheumatol, 2017. **105**(3): p. 6-12.
26. Tournadre, A., *Statins, myalgia, and rhabdomyolysis*. Joint Bone Spine, 2019. **5**(19): p. 30016-8.
27. Adabbo, M., et al., *Laserterapia acelera o processo de reparação de lesão muscular em ratos*. 2014, Universidade Federal de São Carlos: Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica.
28. Tomazoni, S.S., et al., *Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats-part 1: morphological and functional aspects*. Lasers Med Sci, 2017. **32**(9): p. 2111-2120.
29. Nascimento, T.L.S., M. T; Miyabara, E. H., *BGP-15 improves contractile function of regenerating soleus muscle*. J Muscle Res Cell Motil, 2018. **39**(1-2): p. 25-34.
30. Falcai, M.J., et al., *Biomechanical and Histological Analysis of the Gastrocnemius in Rats Subjected to Muscle Injury and Treatment with Low-Level Laser Therapy*. Revista Brasileira de Ortopedia, 2010. **45**(4): p. 444-8.
31. Freitas, M.F.d., *Mecanismos centrais da dor músculo-esquelética induzida por carragenina em ratos* in Instituto de Ciências Biomédicas. 2012, Universidade de São Paulo: São Paulo.
32. Freitas, M.F.d., *Avaliação do envolvimento de células microgliciais e citocinas em modelo de dor musculoesquelética.*, in Department of Anatomy 2017, University of São Paulo: São Paulo.
33. Chacur, M.L., D; Hoheisel, U; Mense, S., *Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: an immunohistochemical and behavioural study in rats*. Eur J Pain, 2009. **13**(9): p. 915-23.
34. Rosa, A.S.F., M. F; Rocha, I. R; Chacur, M., *Gabapentin decreases microglial cells and reverses bilateral hyperalgesia and allodynia in rats with chronic myositis*. Eur J Pharmacol, 2017. **799**: p. 111-117.
35. Oliveira, C.G., et al., *Photobiomodulation reduces nociception and edema in a CFA-induced muscle pain model: effects of LLLT and LEDT*. Photochem Photobiol Sci, 2020. **19**(10): p. 1392-1401.
36. Fontes, J.A., et al., *Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response*. Immun Inflamm Dis, 2017. **5**(2): p. 163-176.
37. Billiau, A.M., P., *Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(6): p. 849-60.
38. Walker, C.I.B., et al., *Anti-nociceptive effect of stigmaterol in mouse models of acute and chronic pain*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2017. **390**(11): p. 1163-1172.
39. Beko, K., et al., *Contribution of platelet P2Y12 receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain*. J Thromb Haemost, 2017. **15**(6): p. 1223-1235.

40. Quintao, N.L.M., et al., *Aleurites moluccanus and its main active constituent, the flavonoid 2''-O-rhamnosylswertisin, in experimental model of rheumatoid arthritis*. J Ethnopharmacol, 2019. **235**: p. 248-254.
41. Nazemian, V., et al., *Anti-hyperalgesia effect of nanchelating based nano particle, RAc1, can be mediated via liver hepcidin expression modulation during persistent inflammation*. Int Immunopharmacol, 2019. **69**: p. 337-346.
42. Dumont, N.A.B., C. F; Sincennes, M. C; Rudnicki, M. A., *Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration*. Compr Physiol, 2015. **5**(3): p. 1027-59.
43. Raed, S.S.A., G. M; Hasan, A.A; Emad, I.S, *Myogenic Satellite Cells: Biological Milieu and Possible Clinical Applications*. Pak J Biol Sci, 2017. **20**(1): p. 1-11.
44. Schmidt, M., et al., *Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(13): p. 2559-2570.
45. Charge, S.B.R., M. A., *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 209-38.
46. Allsopp, G.L.M., A. K., *Can low-load blood flow restriction training elicit muscle hypertrophy with modest inflammation and cellular stress, but minimal muscle damage?* J Physiol, 2017. **595**(22): p. 6817-6818.
47. Koike, T.E., et al., *Muscle Stem Cell Function Is Impaired in beta2-Adrenoceptor Knockout Mice*. Stem Cell Rev Rep, 2022.
48. Carosio, S.B., M. G; Aucello, M; Musaro, A., *Impact of ageing on muscle cell regeneration*. Ageing Res Rev, 2011. **10**(1): p. 35-42.
49. Han, W.M.J., Y. C; Garcia, A. J., *Engineered matrices for skeletal muscle satellite cell engraftment and function*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2017. **60-61**: p. 96-109.
50. Hawke, T.J.G., D. J., *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(2): p. 534-51.
51. Koike, T.E., et al., *Glutamine supplementation improves contractile function of regenerating soleus muscles from rats*. J Muscle Res Cell Motil, 2022.
52. Tidball, J.G., *Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration*. Compr Physiol, 2011. **1**(4): p. 2029-62.
53. Tidball, J.G., *Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(3): p. 165-178.
54. Wosczyzna, M.N.R., T. A., *A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration*. Dev Cell, 2018. **46**(2): p. 135-143.
55. Duchesne, E.D., S. S; Dumont, N. A., *Impact of Inflammation and Anti-inflammatory Modalities on Skeletal Muscle Healing: From Fundamental Research to the Clinic*. Physical therapy, 2017. **97**(8): p. 807-817.
56. Esteca, M.V., et al., *Loss of Parkin Results in Altered Muscle Stem Cell Differentiation during Regeneration*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
57. Dick, S.A., et al., *Caspase 3 cleavage of Pax7 inhibits self-renewal of satellite cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(38): p. E5246-52.
58. Gonzalez, N.M., J. J; Cabezas, F; de la Vega, E; Bustos, F; Yates, J. R., 3rd; Olguin, H. C., *Ck2-Dependent Phosphorylation Is Required to Maintain Pax7 Protein Levels in Proliferating Muscle Progenitors*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0154919.
59. Le Moal, E., et al., *Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration*. Antioxid Redox Signal, 2017. **27**(5): p. 276-310.

60. Baghdadi, M.B.T., S., *Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration*. Dev Biol, 2018. **433**(2): p. 200-209.
61. Schiaffino, S.P., M. G; Ciciliot, S; Rovere-Querini, P., *Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration*. FEBS J, 2017. **284**(4): p. 517-524.
62. Floss, T., H.H. Arnold, and T. Braun, *A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration*. Genes Dev, 1997. **11**(16): p. 2040-51.
63. Han, D., et al., *A TGFbeta-Smad4-Fgf6 signaling cascade controls myogenic differentiation and myoblast fusion during tongue development*. Development, 2012. **139**(9): p. 1640-50.
64. Pawlikowski, B., et al., *Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors*. Dev Dyn, 2017. **246**(5): p. 359-367.
65. Doukas, J., et al., *Delivery of FGF genes to wound repair cells enhances arteriogenesis and myogenesis in skeletal muscle*. Mol Ther, 2002. **5**(5 Pt 1): p. 517-27.
66. Xu, Y., et al., *Characterization and expression analysis of FGF6 (fibroblast growth factor 6) genes of grass carp (Ctenopharyngodon idellus) reveal their regulation on muscle growth*. Fish Physiol Biochem, 2019. **45**(5): p. 1649-1662.
67. Jia, W.H., et al., *Effects of fasting on the expression pattern of FGFs in different skeletal muscle fibre types and sexes in mice*. Biol Sex Differ, 2020. **11**(1): p. 9.
68. Cai, Q., et al., *FGF6 enhances muscle regeneration after nerve injury by relying on ERK1/2 mechanism*. Life Sci, 2020. **248**: p. 117465.
69. Miyabara, E.H.A., M. S; Soares, A. G; Moriscot, A. S., *Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A*. Cell Tissue Res, 2005. **319**(3): p. 479-89.
70. Schiaffino, S., *Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies*. FEBS J, 2018. **285**(20): p. 3688-3694.
71. Nascimento, T.L., et al., *Radicalol enhances the regeneration of skeletal muscle injured by crotoxin via decrease of NF-kB activation*. Toxicol, 2019. **167**: p. 6-9.
72. Krieger, J., et al., *3D skeletal muscle fascicle engineering is improved with TGF-beta1 treatment of myogenic cells and their co-culture with myofibroblasts*. PeerJ, 2018. **6**: p. e4939.
73. Ismaeel, A., et al., *Role of Transforming Growth Factor-beta in Skeletal Muscle Fibrosis: A Review*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(10).
74. Cohn, R.D., et al., *Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 204-10.
75. Egerman, M.A., et al., *GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration*. Cell Metab, 2015. **22**(1): p. 164-74.
76. Acharjee, S., et al., *Sharp-1 regulates TGF-beta signaling and skeletal muscle regeneration*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 3): p. 599-608.
77. Gonzalez, D., et al., *ALS skeletal muscle shows enhanced TGF-beta signaling, fibrosis and induction of fibro/adipogenic progenitor markers*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0177649.
78. Kim, J. and J. Lee, *Plasma MMP-9, TIMP-1, and TGF-beta1 Responses to Exercise-Induced Muscle Injury*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(2).
79. Valle-Tenney, R., et al., *Role of hypoxia in skeletal muscle fibrosis: Synergism between hypoxia and TGF-beta signaling upregulates CCN2/CTGF expression specifically in muscle fibers*. Matrix Biol, 2020. **87**: p. 48-65.

80. Leal-Junior, E.C.J., D. S; Saltmarche, A; Demchak, T., *Adjunctive use of combination of super-pulsed laser and light-emitting diodes phototherapy on nonspecific knee pain: double-blinded randomized placebo-controlled trial.* Lasers Med Sci, 2014. **29**(6): p. 1839-47.
81. Adabbo, M., et al., *Effects of Low-Level Laser Therapy Applied Before Treadmill Training on Recovery of Injured Skeletal Muscle in Wistar Rats.* Photomed Laser Surg, 2016. **34**(5): p. 187-93.
82. Baxter, G.D., et al., *Low level laser therapy (Photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review.* BMC cancer, 2017. **17**(1): p. 833.
83. Andreo, L., et al., *Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury.* Lasers in Medical Science, 2017. **32**(9): p. 2155-2165.
84. Machado, A.C., et al., *Is photobiomodulation (PBM) effective for the treatment of dentin hypersensitivity? A systematic review.* Lasers Med Sci, 2018. **33**(4): p. 745-753.
85. Baxter, G.D., et al., *Low level laser therapy (Photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review.* BMC cancer, 2017. **17**(1): p. 017-3852.
86. Ketz, A.K.B., K. R; Grunberg, N. E; Kasper, C. E; Osborne, L; Pryor, B; Tosini, N. L; Wu, X; Anders, J. J., *Characterization of Macrophage/Microglial Activation and Effect of Photobiomodulation in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain.* Pain Med, 2017. **18**(5): p. 932-946.
87. Hamblin, M.R., *Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation.* Photochem Photobiol, 2018. **94**(2): p. 199-212.
88. Dompe, C., et al., *Photobiomodulation-Underlying Mechanism and Clinical Applications.* J Clin Med, 2020. **9**(6).
89. Karu, T., *Is it time to consider photobiomodulation as a drug equivalent?* Photomed Laser Surg, 2013. **31**(5): p. 189-91.
90. Hamblin, M.R., *Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation.* AIMS biophysics, 2017. **4**(3): p. 337-361.
91. Agrawal., M.H.M.V.P.d.S.T., *Handbook of Low-Level Laser Therapy.* 2016, United States: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.
92. Ferraresi, C.H., Y. Y; Hamblin, M. R., *Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance?* Journal of biophotonics, 2016. **9**(11-12): p. 1273-1299.
93. Pandeshwar, P., et al., *Photobiomodulation in oral medicine: a review.* Journal of investigative and clinical dentistry, 2016. **7**(2): p. 114-26.
94. de Freitas, L.F. and M.R. Hamblin, *Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy.* IEEE journal of selected topics in quantum electronics : a publication of the IEEE Lasers and Electro-optics Society, 2016. **22**(3).
95. Oliveira, M.E., et al., *Low level laser therapy alters satellite glial cell expression and reverses nociceptive behavior in rats with neuropathic pain.* Photochem Photobiol Sci, 2017. **16**(4): p. 547-554.
96. Clijisen, R., et al., *Effects of low-level laser therapy on pain in patients with musculoskeletal disorders: a systematic review and meta-analysis.* European journal of physical and rehabilitation medicine, 2017. **53**(4): p. 603-610.

97. Huang, Z., et al., *The effectiveness of low-level laser therapy for nonspecific chronic low back pain: a systematic review and meta-analysis*. *Arthritis research & therapy*, 2015. **17**: p. 360.
98. Magri, L.V., et al., *Effectiveness of low-level laser therapy on pain intensity, pressure pain threshold, and SF-MPQ indexes of women with myofascial pain*. *Lasers in Medical Science*, 2017. **32**(2): p. 419-428.
99. Alessi Pissulin, C.N., et al., *Low-level laser therapy (LLLT) accelerates the sternomastoid muscle regeneration process after myonecrosis due to bupivacaine*. *J Photochem Photobiol B*, 2017. **168**: p. 30-39.
100. Martins, D.O.d.S., F.M; de Oliveira, M.E; de Britto, L. R; Lemos, J.B.D.L; Chacur, M., *Laser therapy and pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins*. *J Neurotrauma*, 2013. **30**(6): p. 480-6.
101. Martins, D.O.D.S., F. M; Ciena, A. P; Watanabe, I. S; de Britto, L. R. G; Lemos, J. B. D; Chacur, M., *Neuropeptide expression and morphometric differences in crushed alveolar inferior nerve of rats: Effects of photobiomodulation*. *Lasers Med Sci*, 2017. **32**(4): p. 833-840.
102. Rocha, I.R.C., A. P; Rosa, A. S; Martins, D. O; Chacur, M., *Photobiostimulation reverses allodynia and peripheral nerve damage in streptozotocin-induced type 1 diabetes*. *Lasers Med Sci*, 2017. **32**(3): p. 495-501.
103. Vieira, W.F., et al., *Raman spectroscopy of dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic neuropathic rats submitted to photobiomodulation therapy*. *J Biophotonics*, 2019. **12**(11): p. e201900135.
104. Dong, J.X., D., *Applications of Light Emitting Diodes in Health Care*. *Annals of biomedical engineering*, 2017. **45**(11): p. 2509-2523.
105. Campos, G.R.S., et al., *Light emitting diode (LED) therapy reduces local pathological changes induced by Bothrops asper snake venom*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 2018. **152**: p. 95-102.
106. Higgins, P.E.H., K; Windon, L. 3rd; Chasse, P., *Light-Emitting Diode Versus Sham in the Treatment of Plantar Fasciitis: A Randomized Trial*. *Journal of chiropractic medicine*, 2015. **14**(1): p. 10-4.
107. Borges, L.S., et al., *Light-emitting diode phototherapy improves muscle recovery after a damaging exercise*. *Lasers in Medical Science*, 2014. **29**(3): p. 1139-44.
108. Hamblin, M.R., *How to Write a Good Photobiomodulation Article*. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*, 2019. **37**(6): p. 325-326.
109. Tuner, J., *Photobiomodulation: How Many Sessions and How Often?* *Photomed Laser Surg*, 2018. **36**(2): p. 59-60.
110. Zimmermann, M., *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. *Pain*, 1983. **16**(2): p. 109-10.
111. Percie du Sert, N., et al., *The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research*. *PLoS Biol*, 2020. **18**(7): p. e3000410.
112. Correia Rocha, I.R. and M. Chacur, *Modulatory effects of photobiomodulation in the anterior cingulate cortex of diabetic rats*. *Photochem Photobiol Sci*, 2021. **20**(6): p. 781-790.
113. Chaplan, S.R., et al., *Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw*. *J Neurosci Methods*, 1994. **53**(1): p. 55-63.

114. Guerrero, A.T., et al., *Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006. **84**(2): p. 244-51.
115. Hargreaves, K., et al., *A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia*. *Pain*, 1988. **32**: p. 77-88.
116. Borato, E.O., J.J.J; Ciena, A.P; Bertolini, G.R.F., *Avaliação imediata da dor e edema em lesão muscular induzida por formalina e tratada com laser 808 nm %J Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2008. **14**: p. 446-449.
117. Paixão, A.P.S., *Soleus and gastrocnemius muscle morphometry after immobilization in the pelvic limb position of rats for 15, 30 and 45 days*, in *Faculty of Medicine*. 2011, Federal University of Minas Gerais: Minas Gerais.
118. Bodine, S.C. and K. Baar, *Analysis of skeletal muscle hypertrophy in models of increased loading*. *Methods Mol Biol*, 2012. **798**: p. 213-29.
119. Fischer, A.H.J., K. A; Rose, J; Zeller, R., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. *CSH Protoc*, 2008. **2008**: p. pdb.prot4986.
120. Vieira, W.F., et al., *Exploring the ability of low-level laser irradiation to reduce myonecrosis and increase Myogenin transcription after Bothrops jararacussu envenomation*. *Photochem Photobiol Sci*, 2021. **20**(4): p. 571-583.
121. de Braganca, A.C., et al., *Vitamin D Deficiency Aggravates the Renal Features of Moderate Chronic Kidney Disease in 5/6 Nephrectomized Rats*. *Front Med (Lausanne)*, 2018. **5**: p. 282.
122. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
123. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
124. Towbin, H.S., T; Gordon, J., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
125. Rohlf., R.R.S.F.J., *Biometry*. 1981, New York W. H. Freeman.
126. Santos, D., et al., *Muscle pain induced by static contraction in rats is modulated by peripheral inflammatory mechanisms*. *Neuroscience*, 2017. **358**: p. 58-69.
127. Rosso, M.P.O., et al., *Photobiomodulation Therapy (PBMT) in Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review*. *Bioengineering (Basel)*, 2018. **5**(2).
128. Langella, L.G., et al., *Photobiomodulation therapy (PBMT) on acute pain and inflammation in patients who underwent total hip arthroplasty-a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial*. *Lasers Med Sci*, 2018. **33**(9): p. 1933-1940.
129. Escudero, J.S.B., et al., *Photobiomodulation therapy (PBMT) in bone repair: A systematic review*. *Injury*, 2019. **50**(11): p. 1853-1867.
130. de Paiva, P.R., et al., *Photobiomodulation therapy (PBMT) and/or cryotherapy in skeletal muscle restitution, what is better? A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial*. *Lasers Med Sci*, 2016. **31**(9): p. 1925-1933.
131. MF, D.E.O., et al., *Low-intensity LASER and LED (photobiomodulation therapy) for pain control of the most common musculoskeletal conditions: a literature review*. *Eur J Phys Rehabil Med*, 2021.



132. Holanda, V.M.C., M. C; Wu, X; Anders, J. J., *The mechanistic basis for photobiomodulation therapy of neuropathic pain by near infrared laser light*. *Lasers in surgery and medicine*, 2017. **49**(5): p. 516-524.
133. Yamada, E.F., et al., *Photobiomodulation therapy in knee osteoarthritis reduces oxidative stress and inflammatory cytokines in rats*. *J Biophotonics*, 2020. **13**(1): p. e201900204.
134. Rocha, I.R., et al., *Photobiostimulation reverses allodynia and peripheral nerve damage in streptozotocin-induced type 1 diabetes*. *Lasers Med Sci*, 2017. **32**(3): p. 495-501.
135. Costa, S.A.P., et al., *The analgesic effect of photobiomodulation therapy (830 nm) on the masticatory muscles: a randomized, double-blind study*. *Braz Oral Res*, 2017. **31**: p. e107.
136. Neves, L.M.S., et al., *Photobiomodulation Therapy Improves Acute Inflammatory Response in Mice: the Role of Cannabinoid Receptors/ATP-Sensitive K(+) Channel/p38-MAPK Signalling Pathway*. *Mol Neurobiol*, 2018. **55**(7): p. 5580-5593.
137. Janzadeh, A., et al., *The effect of chondroitinase ABC and photobiomodulation therapy on neuropathic pain after spinal cord injury in adult male rats*. *Physiol Behav*, 2020. **227**: p. 113141.
138. Silva, L.M.G., et al., *Photobiomodulation therapy on bothrops snake venom-induced local pathological effects: A systematic review*. *Toxicon*, 2018. **152**: p. 23-29.
139. Rodrigues, M., et al., *Photobiomodulation Decreases Hyperalgesia in Complex Regional Pain Syndrome: An Experimental Mouse Model Subjected to Nicotine*. *Lasers Surg Med*, 2020. **52**(9): p. 890-896.
140. Asgar, J., et al., *The role of TRPA1 in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats*. *Neuroscience*, 2015. **310**: p. 206-15.
141. Imbe, H., R. Dubner, and K. Ren, *Masseteric inflammation-induced Fos protein expression in the trigeminal interpolaris/caudalis transition zone: contribution of somatosensory-vagal-adrenal integration*. *Brain Res*, 1999. **845**(2): p. 165-75.
142. Ambalavanar, R., A. Moutanni, and D. Dessem, *Inflammation of craniofacial muscle induces widespread mechanical allodynia*. *Neurosci Lett*, 2006. **399**(3): p. 249-54.
143. Rodrigues, N.C., et al., *Morphological aspects and Cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: an in vivo study*. *Braz J Phys Ther*, 2014. **18**(5): p. 395-401.
144. Alves, A.N., et al., *Comparative effects of low-level laser therapy pre- and post-injury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair*. *Lasers Med Sci*, 2016. **31**(4): p. 679-85.
145. Dourado, D.M., et al., *Benefits of Sebastiania hispida (Euphorbiaceae) extract and photobiomodulation therapy as potentially adjunctive strategies to be explored against snake envenoming*. *Photochem Photobiol Sci*, 2021. **20**(8): p. 1069-1085.
146. 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*, 2016. **95**(10): p. 746-57.

147. Assis, L., et al., *Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion*. *Lasers in Medical Science*, 2013. **28**(3): p. 947-55.
148. Garcia, T.A., et al., *Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats*. *Braz J Phys Ther*, 2017. **21**(6): p. 425-433.
149. Mandelbaum-Livnat, M.M., et al., *Photobiomodulation Triple Treatment in Peripheral Nerve Injury: Nerve and Muscle Response*. *Photomed Laser Surg*, 2016. **34**(12): p. 638-645.
150. Macedo, A.B., et al., *Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0128567.
151. Vieira, W.F., et al., *Vibrational spectroscopy of muscular tissue intoxicated by snake venom and exposed to photobiomodulation therapy*. *Lasers Med Sci*, 2018. **33**(3): p. 503-512.
152. Dourado, D.M., et al., *Effects of photobiomodulation therapy on Bothrops moojeni snake-envenomed gastrocnemius of mice using enzymatic biomarkers*. *Lasers Med Sci*, 2017. **32**(6): p. 1357-1366.
153. Silva, L.M.G., et al., *Photobiomodulation therapy on bothrops snake venom-induced local pathological effects: A systematic review*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 2018. **152**: p. 23-29.
154. Chazaud, B., *Inflammation and Skeletal Muscle Regeneration: Leave It to the Macrophages!* *Trends Immunol*, 2020. **41**(6): p. 481-492.
155. Ryu, H.S., et al., *Improved healing and macrophage polarization in oral ulcers treated with photobiomodulation (PBM)*. *Lasers Surg Med*, 2021.
156. Souza, N.H.C., et al., *Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(10): p. 4922-4934.
157. Sun, J., et al., *Photobiomodulation Therapy Inhibit the Activation and Secretary of Astrocytes by Altering Macrophage Polarization*. *Cell Mol Neurobiol*, 2020. **40**(1): p. 141-152.
158. Reis, V.P.T., M. N.M; Rego, C.M.A; Ferreira A. A.F; Setubal, S.S; Soares, A. M; Zamuner, S. R; Zuliani, J. P., *Light emitting diode (LED) photobiomodulation therapy on murine macrophage exposed to Bothropstoxin-I and Bothropstoxin-II myotoxins*. *Toxicon*, 2019. **172**: p. 45-52.
159. Paredes, A.D., et al., *The Effect of Fluence on Macrophage Kinetics, Oxidative Stress, and Wound Closure Using Real-Time In Vivo Imaging*. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*, 2019. **37**(1): p. 45-52.
160. De Santa, F., et al., *The Role of Metabolic Remodeling in Macrophage Polarization and Its Effect on Skeletal Muscle Regeneration*. *Antioxid Redox Signal*, 2019. **30**(12): p. 1553-1598.
161. Shang, M., et al., *Macrophage-derived glutamine boosts satellite cells and muscle regeneration*. *Nature*, 2020. **587**(7835): p. 626-631.
162. Zhang, J., et al., *Endothelial Lactate Controls Muscle Regeneration from Ischemia by Inducing M2-like Macrophage Polarization*. *Cell Metab*, 2020. **31**(6): p. 1136-1153 e7.

163. Lepper, C., T.A. Partridge, and C.M. Fan, *An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration*. Development, 2011. **138**(17): p. 3639-46.
164. Sambasivan, R., et al., *Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration*. Development, 2011. **138**(17): p. 3647-56.
165. Dee, K.F., M; Mei, Y; Weyman, C. M., *Apoptosis coincident with the differentiation of skeletal myoblasts is delayed by caspase 3 inhibition and abrogated by MEK-independent constitutive Ras signaling*. Cell Death Differ, 2002. **9**(2): p. 209-18.
166. Moriscot, A., et al., *Firearms-related skeletal muscle trauma: pathophysiology and novel approaches for regeneration*. NPJ Regen Med, 2021. **6**(1): p. 17.
167. Fernando, P., et al., *Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11025-30.
168. McLoon, L.K.R., J; Wirtschafter, J; McCormick, K. M., *Continuous myofiber remodeling in uninjured extraocular myofibers: myonuclear turnover and evidence for apoptosis*. Muscle Nerve, 2004. **29**(5): p. 707-15.
169. Ruest, L.B.K., A; Wang, E., *Development-dependent disappearance of caspase-3 in skeletal muscle is post-transcriptionally regulated*. J Cell Biochem, 2002. **86**(1): p. 21-8.
170. Silva, W.J., et al., *miR-29c improves skeletal muscle mass and function throughout myocyte proliferation and differentiation and by repressing atrophy-related genes*. Acta Physiol (Oxf), 2019. **226**(4): p. e13278.
171. Lin, C.Y., et al., *Bidirectional myofiber transition through altering the photobiomodulation condition*. J Photochem Photobiol B, 2020. **212**: p. 112041.
172. Avin, K.G., et al., *Skeletal Muscle Regeneration and Oxidative Stress Are Altered in Chronic Kidney Disease*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0159411.
173. Olguin, H.C., Olwin, B. B., *Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal*. Dev Biol, 2004. **275**(2): p. 375-88.
174. Karalaki, M.F., S; Philippou, A; Koutsilieris, M., *Muscle regeneration: cellular and molecular events*. In Vivo, 2009. **23**(5): p. 779-96.
175. Liu, W. and J.V. Chakkalakal, *The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions*. Curr Top Dev Biol, 2018. **126**: p. 99-124.
176. Kansal, R., et al., *Role of PAX-7 as a tissue marker in mangled extremity: a pilot study*. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2019. **29**(5): p. 1131-1140.
177. Zofkie, W., et al., *Fibroblast growth factor 6 regulates sizing of the muscle stem cell pool*. Stem Cell Reports, 2021. **16**(12): p. 2913-2927.
178. Armand, A.S., et al., *Injection of FGF6 accelerates regeneration of the soleus muscle in adult mice*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1642**(1-2): p. 97-105.
179. Armand, A.S., I. Laziz, and C. Chanoine, *FGF6 in myogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(8): p. 773-8.
180. Hannon, K., et al., *Differentially expressed fibroblast growth factors regulate skeletal muscle development through autocrine and paracrine mechanisms*. J Cell Biol, 1996. **132**(6): p. 1151-9.
181. Pizette, S., et al., *FGF6 modulates the expression of fibroblast growth factor receptors and myogenic genes in muscle cells*. Exp Cell Res, 1996. **224**(1): p. 143-51.

182. Rahbar Layegh, E., et al., *Photobiomodulation therapy improves the growth factor and cytokine secretory profile in human type 2 diabetic fibroblasts*. J Photochem Photobiol B, 2020. **210**: p. 111962.
183. Ten Broek, R.W., S. Grefte, and J.W. Von den Hoff, *Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration*. J Cell Physiol, 2010. **224**(1): p. 7-16.
184. Chen, H., et al., *Silencing COX-2 blocks PDK1/TRAF4-induced AKT activation to inhibit fibrogenesis during skeletal muscle atrophy*. Redox Biol, 2021. **38**: p. 101774.
185. Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono, *TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(5).
186. Liu, X., et al., *Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: The roles of regulatory factors for muscle regeneration*. Cell Biol Int, 2017. **41**(3): p. 228-238.
187. Lefaucheur, J.P. and A. Sébille, *Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta 1 or insulin-like growth factor I*. J Neuroimmunol, 1995. **57**(1-2): p. 85-91.
188. Sassoli, C., et al., *Low intensity 635 nm diode laser irradiation inhibits fibroblast-myofibroblast transition reducing TRPC1 channel expression/activity: New perspectives for tissue fibrosis treatment*. Lasers Surg Med, 2016. **48**(3): p. 318-32.
189. Chang, L.Y., et al., *Proteomic Analysis Reveals Anti-Fibrotic Effects of Blue Light Photobiomodulation on Fibroblasts*. Lasers Surg Med, 2020. **52**(4): p. 358-372.
190. Mesquita-Ferrari, R.A., et al., *Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process*. Lasers Med Sci, 2011. **26**(3): p. 335-40.
191. Chen, B.S., T., *The role of satellite and other functional cell types in muscle repair and regeneration*. J Muscle Res Cell Motil, 2019. **40**(1): p. 1-8.
192. Wang, Y.X.R., M. A., *Satellite cells, the engines of muscle repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 127-33.
193. Asfour, H.A.A., M. Z; Said, R. S., *Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery*. Exp Biol Med (Maywood), 2018. **243**(2): p. 118-128.
194. Zammit, P.S., *Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2017.
195. Esteves de Lima, J. and F. Relaix, *Master regulators of skeletal muscle lineage development and pluripotent stem cells differentiation*. Cell Regen, 2021. **10**(1): p. 31.
196. Hernandez-Hernandez, J.M.G.-G., E. G; Brun, C. E; Rudnicki, M. A., *The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **72**: p. 10-18.
197. Zanou, N.G., P., *Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(21): p. 4117-30.

198. Zhou, Y., et al., *Radiation-induced muscle fibrosis rat model: establishment and valuation*. *Radiat Oncol*, 2018. **13**(1): p. 160.
199. Yoshimoto, Y., et al., *Methods for Accurate Assessment of Myofiber Maturity During Skeletal Muscle Regeneration*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 267.
200. Sun, K.X., et al., *Deletion of phosphatidylserine flippase beta-subunit Tmem30a in satellite cells leads to delayed skeletal muscle regeneration*. *Zool Res*, 2021. **42**(5): p. 650-659.
201. Ciciliot, S. and S. Schiaffino, *Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(8): p. 906-14.
202. Winter, A. and A. Bornemann, *NCAM, vimentin and neonatal myosin heavy chain expression in human muscle diseases*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1999. **25**(5): p. 417-24.
203. Friedmann-Bette, B., et al., *Strength Training Effects on Muscular Regeneration after ACL Reconstruction*. *Med Sci Sports Exerc*, 2018. **50**(6): p. 1152-1161.
204. Sikorska, M., et al., *Beneficial effects of beta-escin on muscle regeneration in rat model of skeletal muscle injury*. *Phytomedicine*, 2021. **93**: p. 153791.
205. Zimowska, M., et al., *Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration*. *Muscle Nerve*, 2017. **55**(3): p. 400-409.
206. De Lima Rodrigues, D., et al., *Effect of prior application with and without post-injury treatment with low-level laser on the modulation of key proteins in the muscle repair process*. *Lasers Med Sci*, 2018. **33**(6): p. 1207-1213.
207. Macedo, M.M., et al., *Photobiomodulation Therapy Modulates Muscle Gene Expression and Improves Performance of Rats Subjected to a Chronic Resistance Exercise Protocol*. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*, 2020. **38**(12): p. 713-719.
208. Shepherd, D.W., et al., *Effects of photobiomodulation therapy on regulation of myogenic regulatory factor mRNA expression in vivo: A systematic review*. *J Biophotonics*, 2022. **15**(2): p. e202100219.
209. Alves, A.N., et al., *Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: a systematic review*. *Am J Phys Med Rehabil*, 2014. **93**(12): p. 1073-85.
210. Glass, G.E., *Photobiomodulation: The Clinical Applications of Low-Level Light Therapy*. *Aesthet Surg J*, 2021. **41**(6): p. 723-738.
211. Garry, G.A.A., M. L; Garry, D. J., *Cardiotoxin Induced Injury and Skeletal Muscle Regeneration*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1460**: p. 61-71.
212. Schmidt, J., *Current Classification and Management of Inflammatory Myopathies*. *J Neuromuscul Dis*, 2018. **5**(2): p. 109-129.

## **ANEXOS**



Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*,  
2020, **19**, 1392

## Photobiomodulation reduces nociception and edema in a CFA-induced muscle pain model: effects of LLLT and LEDT

Camilla Garcia Oliveira,<sup>a</sup> Milena Fernandes Freitas,<sup>a</sup> Marcelo Victor Pires de Sousa,<sup>b</sup> Renata Giorgi<sup>c</sup> and Marucia Chacur<sup>id</sup> \*<sup>a</sup>

Photobiomodulation therapy (PBMT) is an effective therapeutic strategy and a noninvasive method to improve the regulation of inflammation and pain. Our aim was to examine the effects of different doses of PBMT on improvement of edematogenic and nociceptive responses in a myositis model in rats. We administered complete Freund's adjuvant (CFA) into the gastrocnemius muscle (GS) of rats to induce myositis and observe the effect of PBMT using different doses of energy and two types of light sources, a low-level laser (LLL) and light emitting diodes (LED). For this, we evaluated the effects of these different energies to improve nociceptive and edematogenic responses using behavioural tests. In addition, we analysed histological images in animals with myositis induced by CFA. The administration of CFA to the GS induced increased cellular infiltrates, edema and a nociceptive response when compared to animals without myositis. When we treated the CFA-induced myositis animals with PBMT (LLL or LEDT), we observed a decrease in nociception and edema formation. Our results demonstrated that only the major energy for both the LED and LLL was able to remain in a homogeneous form throughout the period analyzed. Based on our results, we suggest that both LLLT and LEDT using the highest dose (3 J) could be an alternative treatment for myositis in rats.

Received 4th February 2020,  
Accepted 17th August 2020

DOI: 10.1039/d0pp00037j

rsc.li/pps

### Introduction

Patients with muscle pain present a number of confounding factors, such as inflammation, musculoskeletal disorders (joint, tendon, and bone muscle fascia) and pain, which can be difficult to treat.<sup>1</sup> Muscle injury occurs frequently in sports, falls and work, and affects young, adult and elderly populations; muscle injury can be traumatic (including crushing, bruising, laceration and freezing) or non-traumatic (caused by acute exhaustive exercise that promotes oxidative stress and muscle damage).<sup>2</sup>

Chronic muscle pain represents a high economic cost, especially for the government, and does not respond well to conventional interventions, which affects people's quality of life. Despite their prevalence, the pathophysiological mechanisms of these disorders are poorly understood.<sup>3</sup>

Different authors have investigated the mechanisms of muscle induced-nociception using an animal model of pain in

the hindlimb;<sup>4–9</sup> however, it is still unclear what specific optical parameters optimize photobiomodulation therapy (PBMT), enhancing analgesic, anti-inflammatory and cell protective effects.

In recent years, the application of photobiomodulation therapy has been demonstrated to be an interesting strategy to accelerate the process of tissue regeneration,<sup>10</sup> reduce the release of inflammatory mediators<sup>11</sup> and promote pain relief.<sup>12–15</sup> PBMT has been shown to have therapeutic properties in different musculoskeletal disorders.<sup>16,17</sup> PBMT has two main light sources, namely, a LLL (low-level laser) and LED (light emitting diodes), which are applied separately or in combination. Both treatments have demonstrated a significant therapeutic advantage with subsequent clinical improvement.<sup>18,19</sup>

Studies have shown that PBMT is able to increase muscle regeneration when applied before or after injury. The results in such cases include the positive modulation of collagen deposition in the muscle repair process, gene expression and inflammatory cytokines.<sup>20</sup> Recent work has shown beneficial effects of photobiomodulation treatment for muscle injury, including reduced oxidative stress, collagen fiber remodelling,<sup>21</sup> induced muscle repair and decreased muscle tissue inflammation<sup>22</sup> and improved muscle morphological recovery.<sup>23–25</sup>

There are different studies on the beneficial effects of PBMT described in the literature, but there are few that

<sup>a</sup>Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brazil. E-mail: chacur@icb.usp.br, camillagarcia@usp.br, freitas.milenaf@gmail.com; Fax: +(55) (11) 3091-8449; Tel: +(55) (11) 3091-8452

<sup>b</sup>TERGOS Research and Education Ltd, Brazil. E-mail: marcelo@brightmed.com.br; Tel: +55-11-957008558

<sup>c</sup>Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, Brazil. E-mail: renata.giorgi@butantan.gov.br; Tel: +55-11-2627-9743









## ANEXO B

*Microscopy and Microanalysis* (2022), 1–6  
doi:10.1017/S1431927622000186

Microscopy<sup>AND</sup>  
Microanalysis

### Original Article

## Ultrastructural and Molecular Development of the Myotendinous Junction Triggered by Stretching Prior to Resistance Exercise

Carolina dos S. Jacob<sup>1</sup>† , Gabriela K. Barbosa<sup>1</sup>† , Mariana P. Rodrigues<sup>1</sup> , Jurandy Pimentel Neto<sup>1</sup> ,  
Lara C. Rocha-Braga<sup>1</sup> , Camilla G. de Oliveira<sup>2</sup> , Marucia Chacur<sup>2</sup>  and Adriano P. Ciena<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Laboratory of Morphology and Physical Activity (LAMAF), Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro 13506-900, SP, Brazil and  
<sup>2</sup>Laboratory of Functional Neuroanatomy of Pain (LAND), Department of Anatomy, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

### Abstract

The myotendinous junction (MTJ) is a highly specialized region of the locomotor apparatus. Here, we investigated the ultrastructural and molecular effects in the MTJ region after static stretching prior to the ladder-based resistance training. Thirty-two male, 60-day old *Wistar* rats were divided into four groups: Sedentary, Resistance Training, Stretching, and Stretching-Resistance Training. The gastrocnemius muscle was processed for transmission electron microscopy techniques and Western blot assay. We observed that the static stretching prior to the ladder-based resistance training increased the MTJ components, the fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF-6 protein expression. Also, we demonstrated the lower transforming growth factor expression and no difference in the lysyl oxidase expression after combined training. The MTJ alterations in response to combined training demonstrate adaptive mechanisms which can be used for the prescription or development of methods to reduce or prevent injuries in humans and promote the myotendinous interface benefit.

**Key words:** FGF, myotendinous interface, resistance training, sarcomere, TGF- $\beta$ 1

(Received 26 November 2021; revised 16 January 2022; accepted 23 January 2022)

### Introduction

Static stretching exercises have been widely performed by persons of all levels of physical activity during rehabilitation programs or strength training warm-ups (Kamonseki et al., 2014; Bouvier et al., 2017) due to the development capability of a bioprotective effect on skeletal muscle and tendon tissue (Morton et al., 2011). The improvement in joint range of motion with stretching exercises triggers structural changes such as the longitudinal addition to the sarcomeres (Peviani et al., 2018). Furthermore, the adaptations on muscle fiber architecture due to the stresses and protein synthesis of training (Nunes et al., 2020) can directly influence the myotendinous junction (MTJ) morphology.

The MTJ is a specialized region between striated skeletal muscle and tendon that presented plasticity in animals exposed to exercise (Jakobsen & Krogsgaard, 2021), aging (Ciena et al., 2011), obesity (Grillo et al., 2021), menopause (Sierra et al., 2018), joint immobilization (Rocha et al., 2021), and in mdx mice (Martinez et al., 2021). Furthermore, the MTJ adapts to different exercise programs such as running (Curzi, 2016) and swimming (Jacob et al., 2019). The regular practice of resistance

training has been the principal intervention for progressive increasing muscle size and strength (Kraemer & Ratamess, 2004). Besides, there are ultrastructural and morphometric adaptations at the MTJ after the resistance training experimental model (Pimentel Neto et al., 2020).

Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) is a regulatory factor (cytokine) that plays a role in fibroblast function, extracellular matrix (ECM) maintenance, and can promote connective tissue fibrosis (Ismaeel et al., 2019). TGF- $\beta$  can regulate the lysyl oxidase (LOX) expression and, in the muscle tissue, LOX modulates TGF- $\beta$  activity by feedback signaling (Laczko & Csiszar, 2020).

In the ECM, LOX catalyzes cross-linking between monomers and promotes elastin and collagen fibers formation (Schmelzer et al., 2019). Moreover, fibroblast growth factors 2 (FGF-2) and 6 (FGF-6) are factors with paracrine activity; FGF-2 plays a role in satellite cell differentiation and proliferation, while FGF-6 acts in tissue regeneration after injury (Pawlikowski et al., 2017). Also, FGF-2 signaling is necessary for ECM remodeling (Fleming et al., 2020).

However, the combination of previous stretching and resistance exercises can promote several adaptations in the entire interface, collaborate with the description of new elements, and possibly characterize and redefine the characteristics of the main area of musculoskeletal injuries. Therefore, in the present research, we investigated the ultrastructural and molecular effects of static stretching prior to the ladder-based resistance training at the MTJ region in adult male *Wistar* rats.

†These authors contributed equally to this study.

\*Corresponding author: Adriano P. Ciena, E-mail: [adriano.ciena@unesp.br](mailto:adriano.ciena@unesp.br)

Cite this article: Jacob CdosS, Barbosa GK, Rodrigues MP, Pimentel Neto J, Rocha-Braga LC, de Oliveira CG, Chacur M, Ciena AP (2022) Ultrastructural and Molecular Development of the Myotendinous Junction Triggered by Stretching Prior to Resistance Exercise. *Microsc Microanal*. doi:10.1017/S1431927622000186