

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Gabriela Silva

**EFEITOS DA TERAPIA COM FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A VIA DE
SINALIZAÇÃO DA INSULINA E MECANISMOS SUBJACENTES, NAS CÉLULAS
MUSCULOESQUELÉTICAS, EM MODELOS DE OBESIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO***

Diamantina

2022

Gabriela Silva

EFEITOS DA TERAPIA COM FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA E MECANISMOS SUBJACENTES, NAS CÉLULAS MUSCULOESQUELÉTICAS, EM MODELOS DE OBESIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Castro Magalhães
Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Trigueiro Amorim

Diamantina

2022

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

S586e Silva, Gabriela
2023 Efeitos da terapia com fotobiomodulação sobre a via de sinalização da insulina e mecanismos subjacentes, nas células musculoesqueléticas, em modelos de obesidade in vivo e in vitro [manuscrito] / Gabriela Silva. -- Diamantina, 2023.
104 p. : il.

Orientador: Prof. Flávio de Castro Magalhães.
Coorientador: Prof. Fabiano Trigueiro Amorim.

Tese (Doutorado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Diamantina, 2022.

1. Diodo emissor de luz. 2. Terapia com fotobiomodulação. 3. Obesidade. 4. Diabetes mellitus tipo 2. 5. Tecido muscular. I. Magalhães, Flávio de Castro. II. Amorim, Fabiano Trigueiro. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

GABRIELA SILVA

**EFEITOS DA TERAPIA COM FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DA
INSULINA E MECANISMOS SUBJACENTES, NAS CÉLULAS MUSCULOESQUELÉTICAS,
EM MODELOS DE OBESIDADE IN VIVO E IN VITRO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível de Doutorado, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS.

Orientador: Prof. Dr. Flávio De Castro Magalhães

Co-orientador: Prof. Dr. Fabiano Trigueiro Amorim

Data de aprovação 06/10/2022.

Prof.Dr. FLÁVIO DE CASTRO MAGALHÃES - UFVJM

Prof.Dr. FABIANO TRIGUEIRO AMORIM - UNM

Prof.Dr.^a ETEL ROCHA VIEIRA - UFVJM

Dr. RENATO CHAVES SOUTO BRANCO - IUPUI

Prof.Dr.^a KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES - UNINOVE



Documento assinado eletronicamente por **Flávio de Castro Magalhães, Docente**, em 19/10/2022, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Etel Rocha Vieira, Docente**, em 19/10/2022, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano T Amorim, Usuário Externo**, em 20/10/2022, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES, Usuário Externo**, em 20/10/2022, às 13:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Chaves Souto Branco, Usuário Externo**, em 20/10/2022, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0880760** e o código CRC **839BA478**.

Dedico este trabalho aos meus antepassados,
fonte de vida, que abriram caminhos, tornando
mais leve a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mostrar-me o caminho, por encorajar-me diante dos desafios, por amparar-me em todos os momentos e por presentear-me com pessoas tão queridas.

À minha amada mãe, Ivanete, minha primeira professora, quem me ensinou os primeiros passos e as primeiras palavras. Se cheguei até aqui, foi graças à essa base forte, construída com seu apoio, dedicação, paciência e amor incondicionais, ao longo de toda esta trajetória. Agradeço de coração por tudo!

Aos meus familiares, especialmente ao meu padrinho Cláudio e à minha tia Irene, pelo afeto que tornou esta caminhada mais leve e pelo suporte em todos os instantes.

Aos meus amigos, pelo carinho e motivação que me impulsionaram nesta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Flávio de Castro Magalhães, e ao meu coorientador, Prof. Fabiano Trigueiro Amorim, por confiarem em meu potencial e guiarem-me pelo caminho da ciência. Sou imensamente grata pela possibilidade inesgotável de aprendizado.

À Profa. Thaís Machado, à Profa. Ana Paula e ao Prof. Murilo Oliveira, do NEA; à Profa. Adelina dos Reis e à colega Gleisy Gonçalves, da UFMG; ao Prof. Leonardo Silveira e aos colegas Dimitrius Santiago, Marcos Vinícius e Hygor Araújo, do OCRC, pelos ensinamentos e por disponibilizarem os laboratórios e equipamentos, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do PPGMCF e do CIPq-Saúde, especialmente à Profa. Etel Rocha Vieira, ao Prof. Danilo de Oliveira, à Profa. Elizabete Esteves, ao Prof. Marco Fabrício e ao Prof. Gustavo de Melo, pelo saber compartilhado e por toda a estrutura e equipamentos colocados à minha disposição.

À Profa. Kristianne Fernandes e ao Dr. Renato Branco, pela imensa contribuição.

Aos técnicos do CIPq-Saúde e aos parceiros de laboratório, pela agradável convivência e boa vontade sempre demonstrada.

Aos colegas do PPGMCF, que se tornaram amigos, por compartilharem comigo alegrias e dificuldades, especialmente à Vanessa Ribeiro e à Bruna Garcia, pela cumplicidade.

À UFVJM, ao PPGMCF e à SBFis, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À FAPEMIG, à CAPES e ao CNPq, por viabilizarem financeiramente este estudo.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A epidemia global da obesidade é um problema crescente e diversas doenças estão associadas a ela, como o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). O DM2 é caracterizado por resistência à insulina (RI). Em estudos anteriores observamos que a fotobiomodulação (PBM - *photobiomodulation*) melhorou a sinalização da insulina em adipócitos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar se a PBM também melhora a sinalização da insulina em células musculoesqueléticas e os mecanismos envolvidos. No primeiro experimento, camundongos (*Swiss albino*) machos receberam dieta controle pobre em gordura (LFC - *low-fat control*) ou dieta rica em gordura (HFD - *high-fat diet*) por 12 semanas. Da 9^a a 12^a semana, receberam tratamento SHAM ou PBM (630 ± 20 nm; 780 mW/cm²; 31,2 J/cm²; 60 J) sendo subdivididos em: LFC-SHAM (n = 8), LFC-PBM (n = 8), HFD-SHAM (n = 9) e HFD-PBM (n = 9). A PBM foi aplicada em 5 pontos: centro do abdômen e membros superiores e inferiores, 1 vez ao dia, 5 dias por semana, durante 4 semanas. A PBM reverteu a deficiência da fosforilação da proteína quinase B (PKB/Akt) na serina 473 (ser473) e inibiu o aumento do conteúdo de β-L-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HADH) e de mitofusina-2, induzidos pela HFD no quadríceps. No segundo experimento, mioblastos de camundongos (C2C12), após diferenciação, foram cultivados em meio *high glucose* apenas, controle (CTRL), ou contendo ácido palmítico (PAL), oleato de sódio e L-carnitina para indução da RI. Depois, receberam tratamento SHAM ou PBM (660 e 850 nm; 9,16 e 19,71 mW/cm²; 2 ou 4 ou 8 J/cm²; 24,4 ou 52,4 ou 76,8 J) aplicado 1 vez. A PBM, nas doses de 4 ou 8 J/cm², reverteu a deficiência da fosforilação da Akt (ser473) e da atividade máxima da citrato sintase e o aumento da fosforilação da c-Jun NH(2) terminal quinase (JNK) (thr183/tyr185), induzidos pelo ácido palmítico. Além disso, nas doses de 2, 4 ou 8 J/cm², a PBM reverteu o aumento do conteúdo de mitofusina-2 e da atividade da superóxido dismutase (SOD), induzidos pelo ácido palmítico. Em conclusão, a PBM melhorou a sinalização da insulina nas células musculoesqueléticas, *in vivo* e *in vitro*, e esse efeito parece envolver a modulação do estado redox e da função mitocondrial, além da atenuação da ativação de quinases de estresse.

Palavras-chave: Diodo emissor de luz. Terapia com fotobiomodulação. Obesidade. Diabetes mellitus tipo 2. Disfunção mitocondrial. Desequilíbrio redox. Inflamação. Lipotoxicidade. Tecido muscular. Células C2C12.

ABSTRACT

The global obesity epidemic is a growing problem and several diseases are associated with it, such as type 2 diabetes mellitus (DM2). DM2 is characterized by insulin resistance. In previous studies, we observed that photobiomodulation (PBM) improved glucose tolerance and insulin signaling in epididymal adipose tissue, in mice fed a high-fat diet (HFD). Therefore, the objective of this study was to investigate whether PBM also improves insulin signaling in musculoskeletal cells and mechanisms involved. In the first experiment, male mice (Swiss albino) received a low-fat control diet (LFC) or HFD for 12 weeks. From the 9th to the 12th week, they received SHAM treatment or PBM (630 ± 20 nm; 780 mW/cm²; $31,2$ J/cm²; 60 J) being subdivided into: LFC-SHAM (n = 8), LFC-PBM (n = 8), HFD-SHAM (n = 9) and HFD-PBM (n = 9). The PBM was applied transcutaneously at 5 points: left and right quadriceps muscle, upper limbs and center of the abdomen, 1 time/day, 5 days/week, for 4 weeks. PBM reversed the deficiency of protein kinase B (PKB/Akt) serine 473 (ser473) phosphorylation and inhibited the HFD-induced increase in β -L-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH) and mitofusine 2 content in the quadriceps. In the second experiment, mice myoblasts (C2C12), after differentiation, were cultured in high glucose medium only, control (CTRL), or containing palmitic acid (PAL), sodium oleate and L-carnitine to induce insulin resistance. Then they received SHAM treatment or PBM (660 and 850 nm; 9,16 and 19,71 mW/cm²; 2 or 4 or 8 J/cm²; 24,4 or 52,4 or 76,8 J), applied 1 time. PBM, at doses of 4 or 8 J/cm², reversed the deficiency of Akt (ser473) phosphorylation and citrate synthase activity and the increase in c-Jun NH(2) terminal kinase (JNK) (thr183/tyr185) phosphorylation, induced by palmitic acid. Furthermore, at doses 2, 4 or 8 J/cm², PBM reversed the increase in mitofusin-2 content and superoxide dismutase (SOD) activity, induced by palmitic acid. In conclusion, PBM improved intracellular insulin signaling in musculoskeletal cells, *in vivo* and *in vitro*, and this effect appears to involve modulation of redox state and mitochondrial function, in addition to attenuation of stress kinase activation.

Keywords: Light-emitting diode. Photobiomodulation. Obesity. Type 2 diabetes mellitus. Mitochondrial dysfunction. Redox imbalance. Inflammation. Lipotoxicity. Muscle tissue. C2C12 cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via de sinalização da insulina.....	23
Figura 2 - Aspectos físicos da luz irradiada por LED	30
Figura 3 - Propriedades ópticas do tecido irradiado.....	32
Figura 4 - Janela óptica no tecido biológico.....	33
Figura 5 - Lei de Arndt-Shultz ou dose-resposta bifásica	34
Figura 6 - Delineamento do Experimento 1	40
Figura 7 - Pontos de aplicação dos tratamentos SHAM e PBM nos camundongos	42
Figura 8 - Esquema de distribuição dos grupos de C2C12 nas placas	49
Figura 9 - Mudanças na morfologia celular em resposta à diferenciação miogênica	50
Figura 10 - PBM nos miotubos C2C12	51
Figura 11 - Aferição da temperatura do poço durante aplicação do LED	53
Figura 12 - Fosforilação da Akt (ser473) no músculo reto femoral de camundongos	61
Figura 13 - Conteúdo de HADH no músculo reto femoral de camundongos	62
Figura 14 - Conteúdo de mitofusina-2 no músculo reto femoral de camundongos	63
Figura 15 - Fosforilação da Akt (ser473) nos miotubos C2C12	64
Figura 16 - Conteúdo de mitofusina-2 nos miotubos C2C12.....	65
Figura 17 - Fosforilação da JNK (thr183/tyr185) nos miotubos C2C12.....	66
Figura 18 - Atividade da citrato sintase nos miotubos C2C12.....	68
Figura 19 - Análise da peroxidação lipídica nos miotubos C2C12.....	69
Figura 20 - Capacidade antioxidante não enzimática nos miotubos C2C12	70
Figura 21 - Atividade da SOD nos miotubos C2C12	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais	40
Tabela 2 - Parâmetros da PBM nos camundongos	42
Tabela 3 - Anticorpos para detecção de proteínas dos camundongos	45
Tabela 4 - Parâmetros da PBM em miotubos C2C12.....	52
Tabela 5 - Temperatura durante a aplicação do LED.....	54
Tabela 6 - Anticorpos para detecção de proteínas dos miotubos C2C12	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA - acetil coenzima A

Akt - proteína quinase B

AS160 - substrato da Akt de 160 kDa

ATP - adenosina trifosfato

BioEx - Laboratório de Biologia do Exercício e Imunometabolismo

BSA - albumina de soro bovino

CAT - catalase

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CIPq-Saúde - Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde do Vale do Jequitinhonha

cm - centímetro

CoA - coenzima A

CoA-SH - coenzima A reduzida

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTRL - controle

DM2 - diabetes mellitus tipo 2

DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA - ácido desoxirribonucleico

Drp1 - proteína relacionada à dinamina 1

DTNB - ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)

DTPA - ácido dietilenotriaminapentaacético

ERK - quinase regulada por sinal extracelular

Fe - ferro

FeSO₄ - sulfato ferroso

Fis1 - proteína de fissão 1

FRAP - poder antioxidante de redução do ferro

EDTA - ácido etilenodiamino-tetra-acético

ERK - quinase regulada por sinal extracelular

g - grama

GAP - proteínas ativadoras de GTPases

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Glut-4 - transportador de glicose 4
GPx - glutational peroxidase
GR - glutational redutase
GSH - glutational reduzida
GST - glutational S-transferase
GTP - guanosina trifosfato
h - hora
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HADH - β-L-hidroxiacil-CoA desidrogenase
HFD - dieta rica em gordura
ICT - Instituto de Ciência e Tecnologia
IKKβ - I kappa B quinase beta
IL - interleucina
IMC - índice de massa corporal
INS - insulina
iNOS - óxido nítrico sintase induzível
IR - receptor de insulina
IRS - substrato do receptor de insulina
J - joule
JNK - c-Jun NH(2) terminal quinase
kDa - kilodáltons
LED - diodo emissor de luz
LFC - dieta controle pobre em gordura
Ly96 - proteína de diferenciação mielóide 2 do co-receptor TLR4
mA - miliampères
MAPK - quinase ativada por mitógeno
MD2 - proteína de diferenciação mielóide 2 do co-receptor TLR4
MDA - malondialdeído
min - minuto
MMP - potencial de membrana mitocondrial
mW - miliwatt
MYD88 - proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88
mtNOS - óxido nítrico sintase mitocondrial

NEA - Núcleo de Experimentação Animal
NF- κ B - factor nuclear kappa B
Nm - nanômetro
NO - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintase
O₂ - oxigênio molecular
OCRC - *Obesity and Comorbidities Research Center*
OMS - Organização Mundial da Saúde
Opa1 - gene da atrofia óptica do tipo 1
p38 - proteína quinase ativada por mitógeno 38
PAL - ácido palmítico
PBM - fotobiomodulação
PBS - tampão fosfato-salino
PDK1 - quinase dependente de fosfoinosítídeos 1
PGC-1 α - co-ativador 1-alfa do receptor gama do peroxissoma ativado por proliferação
PI - fosfoinosítídeo
PI3K - fosfoinosítídeo 3-quinase
PIP3 - fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKB - proteína quinase B
PKC - proteína quinase C
PP2A - proteína fosfatase 2A
PVDF - difluoreto de polivinilideno
Rab - proteínas reguladoras do tráfego de vesículas
RI - resistência à insulina
ROS - espécies reativas de oxigênio
RNS - espécies reativas de nitrogênio
seg - segundo
SDS - dodecil sulfato de sódio
SH - grupo tiol
SH2 - homólogo de Src2
SOD - superóxido dismutase
Src2 - coativador do receptor de esteroide 2
TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBS - tampão tris salina

TBS-T - tampão tris salina - *tween*

TICAM1 - molécula adaptadora contendo domínio TIR 1

TIR - domínio dos receptores do tipo *Toll*

TLR - receptores do tipo *Toll*

TMRM - éster metílico de tetrametil rodamina

TNF - fator de necrose tumoral

TPTZ - ferritripiridiltriazina

TRIF - molécula adaptadora contendo domínio TIR

TRP - potencial receptor transitório

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Unicamp - Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Obesidade e DM2	20
2.2 Sinalização da insulina e captação de glicose	21
2.3 Bases moleculares da RI no contexto da obesidade	23
2.4 Sistema operacional e propriedades do LED	29
2.5 PBM: definição e mecanismos de ação	31
2.6 PBM na RI e mecanismos subjacentes	34
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
3.2.1 <i>Experimento 1</i>	38
3.2.2 <i>Experimento 2</i>	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Experimento 1	39
4.1.1 <i>Animais e condições experimentais</i>	39
4.1.2 <i>Delineamento experimental</i>	39
4.1.3 <i>Dietas</i>	40
4.1.4 <i>Adaptação e PBM</i>	41
4.1.5 <i>Eutanásia</i>	43
4.1.6 <i>Conteúdo e fosforilação de proteínas</i>	43
4.1.7 <i>Análise estatística</i>	45
4.2 Experimento 2	45
4.2.1 <i>Cultura de células C2C12</i>	46
4.2.2 <i>Delineamento experimental</i>	47
4.2.3 <i>Diferenciação celular</i>	49
4.2.4 <i>Indução da RI</i>	50
4.2.5 <i>PBM</i>	51
4.2.6 <i>Temperatura durante a aplicação do LED</i>	53
4.2.7 <i>Viabilidade celular</i>	54
4.2.8 <i>Conteúdo e fosforilação de proteínas</i>	55

4.2.9 Atividade máxima da citrato sintase	57
4.2.10 Parâmetros do estado redox	58
4.2.11 Análise estatística	60
5 RESULTADOS	61
5.1 Experimento 1	61
5.1.1 Conteúdo e fosforilação de proteínas	61
5.2 Experimento 2	63
5.2.1 Conteúdo e fosforilação de proteínas	63
5.2.2 Atividade máxima da citrato sintase	67
5.2.3 Parâmetros do estado redox	68
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	81
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO A - Declaração de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFVJM	104

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, mais de 1,9 bilhão (39%) de adultos, em todo o planeta, tinham sobrepeso, ou seja, possuíam o índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 25 kg/m^2 , e desses, mais de 650 milhões (13%) tinham obesidade, IMC igual ou superior a 30 kg/m^2 (WHO, 2021a). No Brasil, dados recentes mostram que o sobrepeso já atinge 57,2% dos adultos (59,9% dos homens e 55,0% das mulheres) e a obesidade aproximadamente 22,4% dos adultos (22,0% dos homens e 22,6% das mulheres) (BRASIL, 2022). Estima-se que ocorram mais de 2,8 milhões de mortes em decorrência de sobrepeso ou obesidade a cada ano, em todo o mundo (WHO, 2021b). A fim de colocar esse número em perspectiva, de 17 de novembro de 2019 até o dia 27 de agosto de 2022 foram registradas 6.485.188 mortes associadas ao vírus SARS-CoV-2 (JHU, 2022), causador da COVID-19. Esse número corresponde a uma média de 2.161.729 de mortes por ano. Apesar de ser um número alto, ainda está abaixo do número de óbitos anuais relacionados ao sobrepeso e à obesidade. É importante destacar também que o risco de morrer por COVID-19 é maior em pacientes com obesidade (TARTOF *et al.*, 2020; BELCHIOR-BEZERRA *et al.*, 2022).

O aumento da disponibilidade de ácidos graxos, característico da obesidade, pode sobrecarregar a capacidade das células do organismo de oxidar tais moléculas, levando à deposição de gordura ectópica em tecidos como o muscular esquelético e o hepático. Como consequência, ocorre o acúmulo de lipídeos no meio intracelular, que interferem no processo de sinalização da insulina (CHAVEZ e SUMMERS, 2003; SHI *et al.*, 2006; DAVIS *et al.*, 2009; HOLLAND *et al.*, 2011; HASSAN *et al.*, 2016). Essa interferência culmina em prejuízos na capacidade da insulina em inibir a produção endógena de glicose no fígado e em estimular a captação de glicose nos tecidos muscular esquelético e adiposo, caracterizando o quadro de resistência à insulina (RI) (SAMUEL e SHULMAN, 2016). Por sua vez, essas alterações levam ao aumento nas concentrações circulantes de glicose, o que exige maior produção de insulina pelas células beta pancreáticas, como compensação, para manter a homeostase glicêmica. A persistência dessas alterações pode levar ao estresse e ao colapso das células beta, reduzindo drasticamente a disponibilidade de insulina, que em associação à RI agravada, resultará em hiperglicemia crônica e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) (SHIM *et al.*, 2020).

Como visto, a RI é uma condição primária no curso do DM2 e, apesar dos mecanismos de seu desenvolvimento ainda não estarem totalmente elucidados, há evidências

da participação de pelo menos três fatores cruciais nesse processo. Diversos estudos mostram que o aumento dos ácidos graxos livres está associado à elevação na produção de espécies reativas, moléculas instáveis aptas a transformarem outras moléculas com as quais reagem, culminando no desequilíbrio redox (DUVAL *et al.*, 2007; LAMBERTUCCI *et al.*, 2008). E há evidências da contribuição do desequilíbrio redox para o desenvolvimento da RI (PILON *et al.*, 2010; ZHAI, BALLINGER e MESSINA, 2011; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2015; RANI *et al.*, 2016). O desbalanço entra a produção das espécies reativas e os mecanismos antioxidantes, característico do desequilíbrio redox, pode afetar a mitocôndria, levando à disfunção dessa organela (SCHRAUWEN e HESSELINK, 2004; INDO *et al.*, 2007). Estudos mostram que a disfunção mitocondrial também está associada ao comprometimento da via de sinalização intracelular da insulina e desenvolvimento da RI (MONTGOMERY e TURNER, 2015; SERGI *et al.*, 2019). A disfunção mitocondrial favorece o acúmulo intracelular de intermediários lipídicos, que interferem na sinalização da insulina, prejudicando o metabolismo da glicose. Outra forma pela qual os ácidos graxos interferem na sinalização intracelular da insulina é por meio da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), também conhecidas como quinases de estresse. Essas proteínas regulam diversas funções celulares, incluindo a proliferação, diferenciação, migração e apoptose (VESELY *et al.*, 2009). Entretanto, as quinases de estresse também podem exercer outras ações, promovendo alterações que afetam a sinalização da insulina e, conseqüentemente, o metabolismo da glicose (HIROSUMI *et al.*, 2002; CUENDA e ROUSSEAU, 2007).

Tendo em vista a estreita associação entre a disfunção mitocondrial e a RI, não surpreende que intervenções que melhoram a função da mitocôndria no músculo esquelético (MARTINS *et al.*, 2012) e em adipócitos (KUSMINSKI e SCHERER, 2012) têm o potencial de aumentar a sensibilidade à insulina nesses tecidos e sistemicamente. As estratégias, não farmacológicas, tradicionalmente utilizadas para tratar a RI, justamente por melhorarem a função mitocondrial e outros parâmetros associados à RI, são a restrição calórica (CIVITARESE *et al.*, 2007; NISOLI *et al.*, 2005) e o treinamento físico (TOLEDO *et al.*, 2007). Mas, apesar de apresentarem bons resultados, essas intervenções apresentam baixa aderência por parte da população (CATENACCI e WYATT, 2007; BLÜHER, 2019). Considerando o crescente número de pessoas com obesidade, faz-se necessária a investigação de outras terapias para tratamento da RI e prevenção ou atenuação do DM2.

A fotobiomodulação (PBM - *photobiomodulation*, do inglês) é uma abordagem terapêutica não-invasiva, segura, economicamente viável e inovadora (HAMBLIN, 2017a), baseada na aplicação de luz de baixa intensidade (menor ou igual a 10 W/cm²) (POSTEN *et*

al., 2005). Dois importantes parâmetros que influenciam os efeitos fotobiológicos da PBM são o comprimento de onda (HAMBLIN e DEMIDOVA, 2006) e a dose, também chamada de densidade de energia ou fluência (ZEIN, SELTING e HAMBLIN, 2018). Os comprimentos de onda vermelho e infravermelho são, descritos até agora, como os de maior bioatividade (HAMBLIN e DEMIDOVA, 2006; KARU, 2010; HAMBLIN, 2017a). E há evidências de que a associação desses comprimentos de onda pode induzir efeitos diferentes dos produzidos pela utilização de cada um separadamente (LIMA, SERGIO e FONSECA, 2020). Em relação à dose, estudos mostram que seu aumento é positivo até certo ponto, a partir do qual seus efeitos tornam-se nulos ou prejudiciais (CHUNG *et al.*, 2012; HAMBLIN, 2017a).

Há evidências *in vitro* (FERRARESI *et al.*, 2015) e *in vivo* (SILVEIRA *et al.*, 2019) de que a PBM melhora a função mitocondrial em células musculares esqueléticas. E os efeitos da PBM sobre a função mitocondrial parecem envolver a redução do desequilíbrio redox (TATMATSU-ROCHA *et al.*, 2016; HEO *et al.*, 2019) e atenuação da ativação de vias inflamatórias (YOSHIMURA, SABINO e RIBEIRO, 2016; SANTOS *et al.*, 2020) que contribuem para ativação de quinases de estresse (TUNCMAN *et al.*, 2006). Em trabalhos anteriores, mostramos que a PBM reduziu a RI em adipócitos de camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD - *high fat diet*, do inglês), também chamada de hiperlipídica (SILVA *et al.*, 2018, 2020). Paralelamente aos nossos estudos e ao encontro dos nossos resultados, Gong *et al.*, (2020, 2021) mostraram que a PBM com comprimento de onda vermelho melhorou a ativação da proteína quinase B (PKB/Akt) em adipócitos IR-3T3-L1 e em miotubos IR-L6, contribuindo para a redução da RI em modelos de DM2. Em conjunto, esses achados mostram que a PBM exerce efeitos positivos sobre a RI, possivelmente envolvendo melhora da função mitocondrial.

Apesar dos resultados positivos já descritos sobre a sinalização da insulina em adipócitos e células musculares, outros parâmetros da PBM precisam ser explorados. Ainda são necessários estudos que investiguem o comportamento dose-resposta nas células musculoesqueléticas e os efeitos da PBM com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho sobre a via de sinalização da insulina. Além disso, são necessários estudos que elucidem melhor os mecanismos envolvidos. Esses, portanto, são os objetivos deste estudo. Nossa hipótese é que a PBM com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho melhorará a sinalização intracelular da insulina em células musculares esqueléticas, assim como a PBM com apenas o comprimento de onda vermelho, e que isso envolverá a diminuição do desequilíbrio redox, a melhora da função mitocondrial e a atenuação da ativação de quinases de estresse.

Para testarmos essa hipótese, fizemos dois experimentos. No primeiro, aplicamos a PBM, com comprimento de onda vermelho, na dose de 31.2 J/cm^2 , em camundongos, para avaliarmos os efeitos sobre a sinalização da insulina no músculo esquelético e mecanismos subjacentes. No segundo, investigamos os efeitos da PBM, com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, em diferentes doses (2, 4 ou 8 J/cm^2), sobre a sinalização intracelular da insulina em miotubos C2C12 e mecanismos envolvidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade e DM2

A obesidade segue em uma obstinada ascensão, em nível mundial, e esse aumento em sua prevalência está associado a diversas causas (CABALLERO, 2019). Dentre essas causas destacam-se o aumento na disponibilidade de alimentos de alto valor energético (RICO-CAMPÀ *et al.*, 2019) e a redução da demanda energética diária, em razão da urbanização e do desenvolvimento de máquinas que reduzem o esforço físico humano (GUTHOLD *et al.*, 2018). Esses fatores ambientais, somados a fatores genéticos, influenciam a expressão fenotípica da obesidade, que é caracterizada pelo ganho excessivo de massa associado ao aumento do tecido adiposo, levando a alterações metabólicas (BLÜHER, 2019).

As consequências do sobrepeso e obesidade são inúmeras. Dados da OMS apontam que o IMC elevado é um fator de risco para doenças não transmissíveis, como alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e DM2 (WHO, 2021a). Essas doenças estão entre as principais razões de morte no mundo. O diabetes, por exemplo, já é considerado uma epidemia global, sendo classificado como a nona principal causa de óbitos em todo o planeta, em 2019 (WHO, 2020). Em 2019, aproximadamente 1,5 milhão de mortes foram atribuídas diretamente ao diabetes, sobretudo ao DM2, que é o mais comum (WHO, 2022). Apesar de nem todos os portadores de DM2 apresentarem sobrepeso ou obesidade, a maioria dos casos ocorre nesses indivíduos (RENDINA-RUEDY e SMITH, 2016).

O DM2 é caracterizado pela RI associada à incapacidade das células beta pancreáticas em manterem concentrações suficientes de insulina, o que resulta em hiperglicemia e glicotoxicidade (SHIM *et al.*, 2020). Perifericamente, a RI reduz a captação de glicose pelo tecido muscular esquelético e adiposo. Outro efeito da RI é que ela prejudica a supressão da lipólise mediada pela insulina e, como consequência, a oferta aumentada de ácidos graxos livres interfere ainda mais no transporte de glicose no músculo esquelético. Além disso, a RI leva ao aumento da produção hepática de glicose (EIKENBERG e DAVY, 2013). A princípio, essa elevação nos níveis de glicose circulante é compensada pelo aumento da secreção de insulina, porém, se o aumento da glicemia é mantido por longos períodos, observa-se o efeito glicotóxico. Ou seja, a RI é intensificada, aumentando a demanda por insulina, o que sobrecarrega as células beta do pâncreas, culminando na disfunção dessas células. O estágio inicial dessa disfunção consiste em tolerância à glicose diminuída, também denominada de intolerância à glicose (KAHN, 1997), que pode progredir para hiperglicemia

crônica e DM2 (STUMVOLL, GOLDSTEIN e VAN HAEFTEN, 2005; KAHN, HULL e UTZSCHNEIDER, 2006; SCHENK, SABERI e OLEFSKY, 2008; KALUPAHANA, MOUSTAID-MOUSSA e CLAYCOMBE, 2012; CZECH, 2017).

2.2 Sinalização da insulina e captação de glicose

A insulina é um importante hormônio peptídico anabólico de 51 aminoácidos, fundamental para a manutenção do metabolismo de glicose, lipídeo e proteína, participando ainda dos processos de diferenciação e crescimento celular (PESSIN e SALTIEL, 2000). Após as refeições, o aumento na concentração plasmática de glicose e aminoácidos estimula as células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans a secretarem insulina (TAGER *et al.*, 1979), que reduz a produção endógena de glicose, através da inibição da glicogenólise e gliconeogênese hepáticas e aumenta sua captação periférica, especialmente pelos miócitos e adipócitos. Concomitantemente, esse hormônio diminui a degradação e aumenta a síntese proteica, enquanto reduz a lipólise no tecido adiposo e aumenta a lipogênese no fígado (SALTIEL e KAHN, 2001).

Como já mencionado, uma das principais ações da insulina é estimular a captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo. Para exercer suas ações intracelulares a insulina primeiramente precisa ligar-se ao receptor específico de membrana, o receptor de insulina (IR - *insulin receptor*, do inglês), uma proteína heterotetramérica com atividade quinase intrínseca, composta por duas subunidades extracelulares alfa (α), de 135 kilodáltons (kDa) cada, dispostas simetricamente e que se ligam, cada uma delas, por pontes de dissulfeto, a uma das duas subunidades transmembranas β , cada uma com 95 kDa, inibindo sua atividade tirosina quinase intrínseca (FIGURA 1; SALTIEL e KAHN, 2001). Ao ligar-se às subunidades α dessa enzima alostérica, a insulina induz mudanças conformacionais, aproximando os domínios quinase, permitindo a autofosforilação cruzada dos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163) das próprias subunidades β . Isso cria sítios para ancoragem dos substratos do receptor de insulina (IRS - *insulin receptor substrate*, do inglês). Os IRS ancorados são também fosforilados em seus resíduos de tirosina. Esses resíduos de fosfotirosina dos IRS são sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia ao coativador do receptor de esteroide 2 (Src2) (SH2) (SALTIEL e KAHN, 2001; KAHN, HULL e UTZSCHNEIDER, 2006).

Já foram descritos seis membros da família dos IRS (WHITE, 1998; CAI *et al.*, 2003). Dentre estes, o IRS1 e o IRS2 destacam-se em relação ao metabolismo e controle

glicêmico (SUN *et al.*, 1991; PREVIS *et al.*, 2000; BOUCHER, KLEINRIDDERS e KAHN, 2014). Dessa forma, a fosforilação em tirosina dos IRS1 e IRS2, pelo IR, permite associação desses, através do domínio de ligação SH2, com a subunidade regulatória p85 da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) que, por sua vez, ativa a subunidade catalítica p110 da PI3K, através da região inter-SH2, recrutando-a para as proximidades da membrana plasmática e promovendo a fosforilação dos fosfoinositídeos (PI) na posição 3 do anel de inositol. Como resultado dessa sequência de eventos, ocorre a formação do fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que ativa a quinase dependente de fosfoinositídeos 1 (PDK1). A enzima PDK1 é uma proteína quinase serina/treonina que fosforila e ativa outras serina/treonina quinases, incluindo a PKB também conhecida como Akt. A Akt é parcialmente ativada por fosforilação de treonina 308 pela PDK1. A ativação completa requer fosforilação do resíduo serina 473, que pode ser catalisado por diversas proteínas, dentre elas a PDK2 (BACKER, MYERS *et al.*, 1992; BACKER, SCHROEDER *et al.*, 1992; SALTIEL e KAHN, 2001).

A Akt, quando ativada, fosforila e inativa seu substrato de 160 kDa (AS160), uma proteína que apresenta domínio GAP (proteínas ativadoras de GTPases) específico para proteínas reguladoras do tráfego de vesículas (Rab). Quando o domínio GAP da AS160 é inibido, ocorre a conversão das Rabs em suas formas ativas levando a reorganização do citoesqueleto e translocação do transportador de glicose 4 (Glut-4) para a membrana da célula, ocorrendo assim a captação de glicose pelas células dos tecidos muscular e adiposo (SALTIEL e KAHN, 2001). Essa proteína pertence a uma família de facilitadores de transporte, da qual fazem parte 12 tipos distintos, dentre os quais, apenas o Glut-4 está predominantemente localizado em compartimentos intracelulares (BROWN e DEMPSEY, 2000; KANZAKI, 2006). O Glut-4 é rapidamente internalizado, por endocitose dependente de clatrina, sendo reencaminhado para o armazenamento em compartimentos intracelulares, quando finalizado o estímulo da insulina (WATSON e PESSIN, 2001; KANZAKI, 2006).

Após ser ativado, o receptor de insulina não sofre autodesativação, sendo necessário, portanto, um processo catalisado por proteínas fosfatases de tirosina, que interagem diretamente com o receptor de insulina e retiram fosfatos de importantes sítios de fosforilação, reduzindo a atividade e revertendo o receptor ao seu estado de quinase inativa (YOUNGREN, 2007). O sinal de ativação da via PI3K/Akt pode ser cessado, por exemplo, por fosfatases que atuam sobre PIP3 através da retirada do fosfato na posição 3 do anel de inositol (WIJESEKARA *et al.*, 2005). Outro mecanismo de regulação da sinalização da insulina é a fosforilação em resíduos de serina e/ou treonina do receptor de insulina e de seus substratos (COPPS e WHITE, 2012).

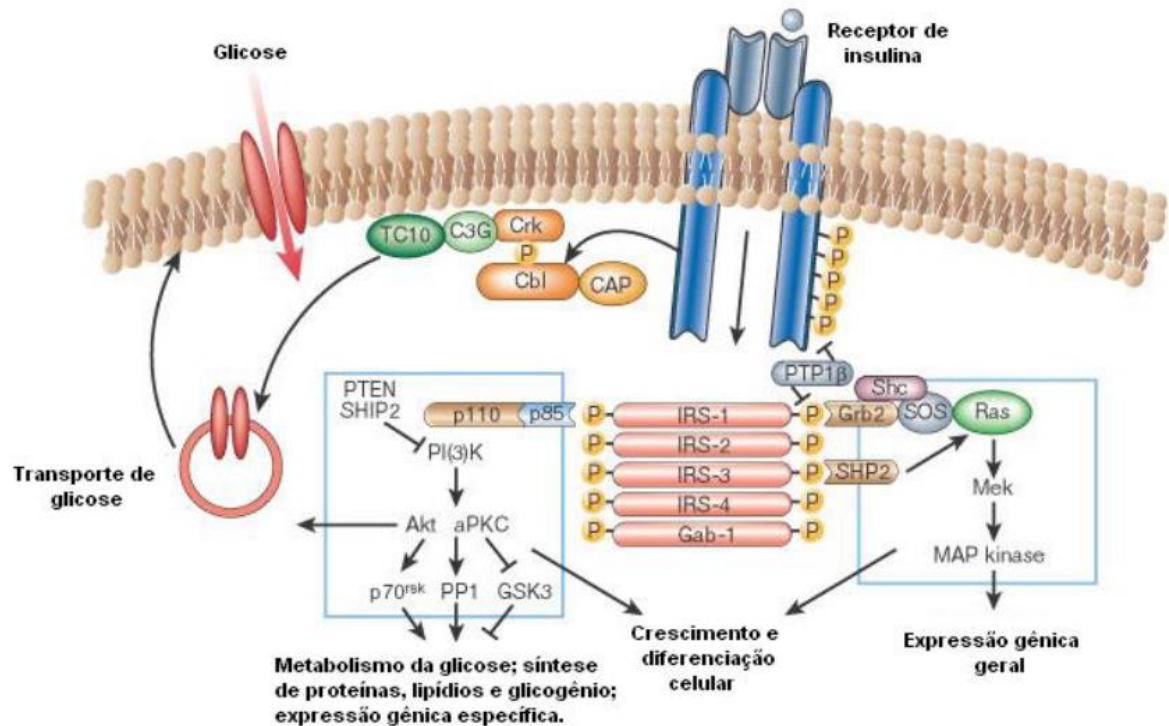


Figura 1 - Via de sinalização da insulina. O receptor de insulina quando ativado promove a fosforilação de resíduos de tirosina de vários substratos proteicos, como IRS, resultando na ativação de vias de sinalização intracelulares. Dentre essas vias destaca-se a PI3K que, quando ativada, promove a translocação de transportadores de glicose, como o Glut-4, levando à captação de glicose. Adaptada de Saltiel e Kahn (2001).

Segundo Hançer *et al.* (2014) a insulina tem uma contribuição importante na fosforilação dos resíduos de serina/treonina do IRS, uma vez que grande parte desses resíduos é fosforilada na presença desse hormônio. Dessa forma, fisiologicamente, a fosforilação de serina/treonina do receptor de insulina e de seus substratos funciona como um mecanismo de *feedback* que se desenvolve durante a estimulação da insulina. Porém, em uma situação patológica, como na obesidade, esse mecanismo pode ser hiperativado por quinases de estresse, inibindo a sinalização da via e caracterizando a RI (HIROSUMI *et al.*, 2002).

2.3 Bases moleculares da RI no contexto da obesidade

A RI corresponde a uma diminuição na capacidade desse hormônio em estimular a utilização de glicose, dentre outras alterações, devido à deficiência no seu receptor ou defeito em algum mecanismo pós-receptor (DANDONA, ALJADA e BANDYOPADHYAY, 2004). Como visto, a ligação da insulina ao seu receptor inicia uma cascata de fosforilação que culmina na exocitose de vesículas que armazenam o Glut-4, promovendo sua translocação

para a membrana plasmática, resultando em uma maior absorção de glicose pelos tecidos alvos. Alterações em qualquer etapa da sinalização da insulina impedirão que esse hormônio exerça sua função de maneira adequada, caracterizando a RI, na qual as concentrações fisiológicas deste hormônio não são suficientes para induzir seus efeitos metabólicos.

Como descrito, a Akt é uma proteína chave na sinalização da insulina. Nesse sentido, diversos trabalhos mostraram que prejuízo na atividade da Akt estimulada pela insulina, em células C2C12 tratadas com palmitato (CHAVEZ e SUMMERS, 2003; FENG *et al.*, 2012), no músculo esquelético de roedores em modelos de obesidade induzida geneticamente ou por dieta (SHAO *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2001; TREMBLAY *et al.*, 2001) e humanos com RI e DM2 (KROOK *et al.*, 1998; ZIERATH, KROOK e WALLBERG-HENRIKSSON, 1998; BROZINICK, ROBERTS e DOHM, 2003; KARLSSON *et al.*, 2005; COZZONE *et al.*, 2008; HØJLUND *et al.*, 2009; TONKS *et al.*, 2013), está correlacionado com redução na captação de glicose. Portanto, é sugerido que a redução na ativação de Akt estimulada por insulina, no músculo esquelético, diminui a translocação de Glut-4 e a captação de glicose.

Os ácidos graxos saturados prejudicam a sensibilidade à insulina *in vivo* e *in vitro* (CHAVEZ e SUMMERS, 2003; SHI *et al.*, 2006; DAVIS *et al.*, 2009; HOLLAND *et al.*, 2011). Eles interferem na sinalização da insulina ativando vias pró-inflamatórias e/ou fornecendo substratos para a síntese de lipídios potencialmente prejudiciais, como o diacilglicerol e as ceramidas. Os ácidos graxos saturados ativam os receptores do tipo Toll (TLR), especialmente o TLR4, que é expresso em diversos tecidos, inclusive no músculo esquelético, para estimular os processos pró-inflamatórios a jusante (CHAVEZ e SUMMERS, 2003; SHI *et al.*, 2006; DAVIS *et al.*, 2009; HOLLAND *et al.*, 2011; TAO *et al.*, 2017). Há evidências de que o ácido palmítico, referido como C16:0 (onde C16 indica o número de átomos de carbono e 0 indica o número de ligações duplas), liga-se diretamente à proteína de diferenciação mielóide 2 do co-receptor TLR4 (MD2, também conhecida como Ly96). O *knockdown* ou a inibição da MD2 impediu a resposta pró-inflamatória ao ácido palmítico (WANG *et al.*, 2017).

A ativação de TLR4 inicia a sinalização de vias intracelulares envolvendo proteínas adaptadoras, como a proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MYD88) e o interferon- β , que é indutor da molécula adaptadora contendo domínio TIR (TRIF, também conhecida como TICAM1), que ativam vias pró-inflamatórias para aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas pró-inflamatórias induzem cascatas de sinalização *feedforward* para exacerbar os efeitos pró-inflamatórios. Acredita-se que a

ativação da I kappa B quinase beta (IKK β) e da JNK, mediada por TLR4, provavelmente via MYD88, medeia diretamente a RI induzida por ácidos graxos saturados. De fato, camundongos *knockout* para IKK β e JNK são protegidos da resistência à insulina induzida por HFD (YUAN *et al.*, 2001; HIROSUMI *et al.*, 2002), mas o mecanismo ainda precisa ser elucidado.

Os ácidos graxos saturados são ainda substratos para diacilglicerol e ceramidas, que também podem prejudicar a ação da insulina. O diacilglicerol e outros acil CoA, em excesso, ativam as isoformas da proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, diminuem as atividades da PI3K e do ISR-1 na via de sinalização da insulina para captação de glicose, nas células musculoesqueléticas (ERION e SHULMAN, 2010; SZENDROEDI *et al.*, 2014). Já as ceramidas, em excesso, ativam a proteína fosfatase 2A (PP2A) e a PKC-zeta, contribuindo também para a inibição da captação de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético (CHAURASIA e SUMMERS, 2015; CHEN *et al.*, 2017).

Outro efeito conhecido dos ácidos graxos saturados no contexto da RI associada à obesidade é o desequilíbrio redox. O desequilíbrio redox corresponde ao desbalanço entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*, do inglês) e de nitrogênio (RNS - *reactive nitrogen species*, do inglês) (SIES e JONES, 2007). As espécies reativas participam na modulação de várias condições fisiológicas importantes como a ativação da expressão gênica, de receptores da sinalização celular e no controle do tônus vascular (ALLEN e TRESINI, 2000; HEHNER *et al.*, 2000; HENSLEY *et al.*, 2000). No entanto, quando a produção de ROS e RNS excede a capacidade antioxidante, elas induzem processos danosos. Os lipídeos são os alvos biológicos mais comuns de oxidação pelas ROS e RNS, processo denominado peroxidação lipídica (GATÉ *et al.*, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), mas as proteínas também podem sofrer danos oxidativos (SHACTER, 2000), assim como o ácido desoxirribonucleico (DNA) (MAYNE, 2003).

Existem dois mecanismos antioxidantes endógenos, encontrados nos meios intra e extracelulares, com a finalidade de controlarem os efeitos das espécies reativas nas células, os enzimáticos e os não-enzimáticos (POWERS e LENNON, 1999). Os antioxidantes enzimáticos catalisam reações com a finalidade de removerem as espécies reativas ou reduzirem as moléculas oxidadas. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona S-transferase (GST), peroxirredoxinas e tioredoxinas. Os antioxidantes não-enzimáticos possuem a capacidade de interromperem reações de oxidorredução e os principais

incluem a glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E e ácido úrico (WAYNER *et al.*, 1987; SIES e STAHL, 1995; POWERS e JACKSON, 2008).

Algumas moléculas podem ser usadas como marcadores de estado redox da célula ou tecido. A maioria das espécies reativas têm meia vida curta e reagem rapidamente com biomoléculas. Os principais marcadores de estado redox são as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *thiobarbituric acid-reactive substances*, do inglês), que indicam dano oxidativo aos lipídeos (ESTERBAUER, SCHAUR e ZOLLNER, 1991), e os derivados carbonílicos em proteínas, que indicam dano oxidativo a proteínas (LEVINE *et al.*, 1994).

Modelos celulares de RI apresentam persistente aumento na produção de ROS (HOUSTIS, ROSEN e LANDER, 2006). Animais tratados com agentes oxidantes têm piora na RI (OGIHARA *et al.*, 2004; BLOUET *et al.*, 2007), enquanto animais tratados com antioxidantes apresentam maior sensibilidade à insulina (ZHAI, BALLINGER e MESSINA, 2011). Foram observados, em pacientes com obesidade, o aumento da peroxidação lipídica e de marcadores de dano oxidativo a proteínas, concomitantemente à redução da atividade de enzimas antioxidantes mitocondriais (SOD e GPx) (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2015). Ademais, evidências mostram que o DM2 está associado com o aumento na formação de ROS e RNS e com a redução do potencial antioxidante (RANI *et al.*, 2016). Em conjunto, esses achados mostram o importante papel exercido pelo desequilíbrio redox no desenvolvimento da RI.

As mitocôndrias estão expostas às ROS e também às RNS, seja pelo óxido nítrico produzido pela iNOS ou por uma isoforma dessa enzima conhecida como NOS mitocondrial (mtNOS). Interessante ressaltar que a iNOS tem sua expressão induzida por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF (NAIK e DIXIT, 2011). Uma vez ativada, essa enzima produz grandes quantidades de NO e por longos períodos de tempo (BROWN, 2001). Ademais, foi demonstrado que ROS atuam como moléculas sinalizadoras para a síntese de citocinas pró-inflamatórias (NAIK e DIXIT, 2011), que podem aumentar a produção de NO pela iNOS, causando uma ação em cadeia de aumento na produção de ROS e RNS e de citocinas pró-inflamatórias. A exposição das mitocôndrias por longo prazo ao desequilíbrio redox pode danificar sua estrutura e DNA, o que pode resultar em disfunção mitocondrial (SCHRAUWEN e HESSELINK, 2004; INDO *et al.*, 2007). Além disso, diversas evidências apontam para a participação de RNS no bloqueio da respiração mitocondrial por meio da ligação reversível do NO com a citocromo c oxidase (BROWN, 2001), a última enzima da cadeia transportadora de elétrons que catalisa a formação de água e também transloca prótons para o espaço intermembranoso mitocondrial, criando o gradiente eletroquímico responsável

pela síntese de adenosina trifosfato (ATP) por meio da ATP sintase. Uma vez ligado à citocromo c oxidase, o NO inibe, portanto, a ação dessa enzima, bloqueando a respiração mitocondrial. Sabe-se que o bloqueio da respiração mitocondrial também aumenta a produção de ROS (NABBEN *et al.*, 2011).

Nesse contexto, vários estudos mostraram que a função, conteúdo e capacidade oxidativa mitocondrial estão reduzidos em pessoas com obesidade e resistência à insulina e com DM2 (HOLLOWAY *et al.*, 2007; SCHRAUWEN-HINDERLING *et al.*, 2007). Interessante notar que existem evidências mostrando que ácidos graxos modulam a expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose e de lipídeos (SCHMID *et al.*, 2004). Schmid *et al.*, (2004) demonstraram que camundongos submetidos à dieta rica em gordura apresentavam alteração e redução na expressão de ATP sintase no músculo esquelético. Além disso, conteúdo aumentado de lipídeos intramusculares está associado com redução da expressão do co-ativador 1-alfa do receptor gama do peroxissoma ativado por proliferação (PGC-1 α), um regulador chave da biogênese e função mitocondrial, e redução da expressão gênica dos complexos respiratórios I, II, III e IV (SPARKS *et al.*, 2005), resultando em disfunção e redução na biogênese mitocondrial (PETERSEN *et al.*, 2004). Essas alterações na expressão gênica e proteica de enzimas que desempenham papel na função e biogênese mitocondrial induzidas por ácidos graxos contribuem para redução da capacidade oxidativa levando conseqüentemente à disfunção mitocondrial.

Apesar de ainda não estar claro se a disfunção mitocondrial é causa ou consequência da RI, evidências apontam uma relação entre essas duas condições (HOLLOWAY *et al.*, 2007; SCHRAUWEN-HINDERLING *et al.*, 2007; MONTGOMERY e TURNER, 2015; SERGI *et al.*, 2019). Alteração da função mitocondrial foi demonstrada em seres humanos e camundongos com obesidade, RI e DM2 (KELLEY *et al.*, 1999; LOWELL e SHULMAN, 2005; CIVITARESE e RAVUSSIN, 2008; WILDE *et al.*, 2008; YUZEFOVYCH *et al.*, 2013; MONTGOMERY e TURNER, 2015). Especificamente, muitos estudos observaram redução da massa mitocondrial no músculo esquelético, na obesidade e DM2 (KELLEY *et al.*, 2002; MORINO *et al.*, 2005; RITOV *et al.*, 2005), bem como taxas de respiração máxima diminuídas no músculo esquelético em pacientes com DM2 (MOGENSEN *et al.*, 2007).

A função mitocondrial está relacionada ao transporte de ácidos graxos, β -oxidação, atividade do ciclo de Krebs, síntese de acetil coenzima A (acetil-CoA) e atividade da cadeia transportadora de elétrons. Foi demonstrado que camundongos, que consumiram uma dieta hiperlipídica, desenvolveram RI e diminuição da tolerância à glicose e

apresentaram alterações nas proteínas de β -oxidação do músculo esquelético, principalmente uma abundância de β -L-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HADH), uma enzima chave para β -oxidação (VENTURA-CLAPIER, GARNIER e VEKSLER, 2008). Também foi observado que a citrato sintase, enzima que participa da primeira reação do ciclo de Krebs e que tem sido utilizada como biomarcador de conteúdo e função mitocondrial (LARSEN *et al.*, 2012; JACOBS *et al.*, 2013), apresentou atividade reduzida, insensível à estimulação por insulina, em miotubos estabelecidos a partir de indivíduos com DM2, enquanto a insulina estimulou a atividade da citrato sintase em 26 a 33% nos miotubos estabelecidos a partir de indivíduos controle magros e obesos, sendo que o efeito estimulador da insulina foi abolido na presença de altas concentrações de palmitato (ØRTENBLAD *et al.*, 2005).

A função da mitocôndria está intimamente relacionada à sua morfologia, que é resultado de processos de fusão e fissão, chamados coletivamente de dinâmica mitocondrial (WESTERMANN, 2010, 2012). A fusão é controlada por mitofusinas 1 e 2 e gene da atrofia óptica do tipo 1 (Opa1) (CIPOLAT *et al.*, 2004; PALMER *et al.*, 2011), enquanto a fissão é controlada pela proteína relacionada à dinamina 1 (Drp1) e proteína de fissão 1 (Fis1) (NUNNARI *et al.*, 2002; LIESA, PALACÍN e ZORZANO, 2009). Alterações na dinâmica mitocondrial foram observados na RI e no DM2 (BACH *et al.*, 2003, 2005; YU, ROBOTHAM e YOON, 2006; LIESA, PALACÍN e ZORZANO, 2009; ZORZANO, LIESA e PALACIN, 2009; HERNÁNDEZ-ALVAREZ *et al.*, 2010; ZORZANO *et al.*, 2010; QUIRÓS *et al.*, 2012; LIESA e SHIRIHAI, 2013).

Martins *et al.* (2012) propuseram um modelo integrativo no qual a disfunção mitocondrial, caracterizada por redução na massa mitocondrial, na síntese de ATP, no consumo de oxigênio e na fosforilação oxidativa, teria papel central na RI induzida por ácidos graxos. De acordo com esses autores, a obesidade aumenta a concentração circulante e conseqüentemente o conteúdo intramuscular de ácidos graxos, o que por sua vez, reduz a expressão de genes envolvidos na biogênese e capacidade oxidativa mitocondrial, além de desencadear o desequilíbrio redox por meio da produção de ROS e RNS. Como consequência, a massa mitocondrial é reduzida, assim como sua capacidade oxidativa. A redução da capacidade oxidativa mitocondrial juntamente com o acúmulo de ácidos graxos intramusculares leva a ativação de vias inflamatórias.

Interessantemente, Coletta e Mandarino (2011) demonstraram que alterações em genes e proteínas da via inflamatória contribuem para a disfunção mitocondrial e que isso pode levar a redução na oxidação de lipídeos, acúmulo de gordura intramuscular, anormalidades na sinalização da insulina e finalmente a RI. A ativação de vias inflamatórias

intramusculares leva à ativação de quinases de estresse, como a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína quinase ativada por mitógeno 38 (p38) e JNK. A ativação dessas quinases está relacionada com o desenvolvimento da RI por inibirem a ativação em tirosina do IRS1, um passo intracelular fundamental para captação de glicose estimulada por insulina (FUJISHIRO *et al.*, 2003).

Em resumo, o modelo proposto por Martins *et al.* (2012) integra os mecanismos apontados na literatura para a participação de ácidos graxos na RI induzida pela obesidade. O aumento no conteúdo de ácidos graxos intramusculares leva à disfunção mitocondrial por meio do aumento do desequilíbrio redox, ativação de vias inflamatórias e alteração na expressão de genes relacionados à biogênese e à função mitocondrial. Interessantemente, existem evidências que sugerem que a disfunção mitocondrial preceda o aparecimento da RI (RECTOR *et al.*, 2010). Em uma revisão recente, Sergi *et al.* (2019) apresentam um compilado de evidências que corroboram com esse modelo proposto por Martins *et al.* (2012).

Diante do exposto, é esperado que intervenções que melhorem a função mitocondrial no músculo esquelético (MARTINS *et al.*, 2012) e em adipócitos (KUSMINSKI e SCHERER, 2012) tenham o potencial de melhorar a sensibilidade à insulina. As estratégias não farmacológicas convencionalmente utilizadas no tratamento do DM2 são o treinamento físico aeróbico (TOLEDO *et al.*, 2007) e a restrição calórica (NISOLI *et al.*, 2005; CIVITARESE *et al.*, 2007), justamente porque elas aumentam a função mitocondrial, junto a outros efeitos positivos (WILSON-FRITCH *et al.*, 2004) e, por consequência, melhoram a sensibilidade à insulina. Entretanto, essas mudanças no estilo de vida, como a adoção de dieta e exercício físico, encontram grande resistência e também baixa aderência por parte da população (CATENACCI e WYATT, 2007; BLÜHER, 2019). Diante disso, fica evidenciada a necessidade de investigação de outras terapias, que atuem melhorando a função mitocondrial, a fim de prevenir e/ou tratar a RI, como a PBM com laser (KARU, 2010; AVCI *et al.*, 2013) ou diodo emissor de luz (LED) (EELLS *et al.*, 2004; FERRARESI *et al.*, 2015).

2.4 Sistema operacional e propriedades do LED

O LED é um dispositivo semicondutor optico-eletrônico, formado de junção p-n (p – empobrecida de elétrons; n – enriquecida de elétrons) que, ao ser diretamente polarizada, quando o aparelho é energizado, faz com que os elétrons cruzem a barreira de potencial e se recombinem com as lacunas, emitindo energia em forma de luz, processo denominado “eletroluminescência” (BAGNATO *et al.*, 2006). Por não possuir cavidade óptica, sua luz,

quase monocromática, é desprovida de coerência (FIGURA 2A) e colimação (FIGURA 2B). Ou seja, suas ondas não estão em fase e seus fótons não são paralelos, apresentando uma sutil variação de tonalidade e perdendo intensidade à medida em que a luz se distancia do ponto de origem (BAGNATO, 2002; BAXTER, 2003; COSTA, CORRAL-BAQUÉS e AMAT, 2007).

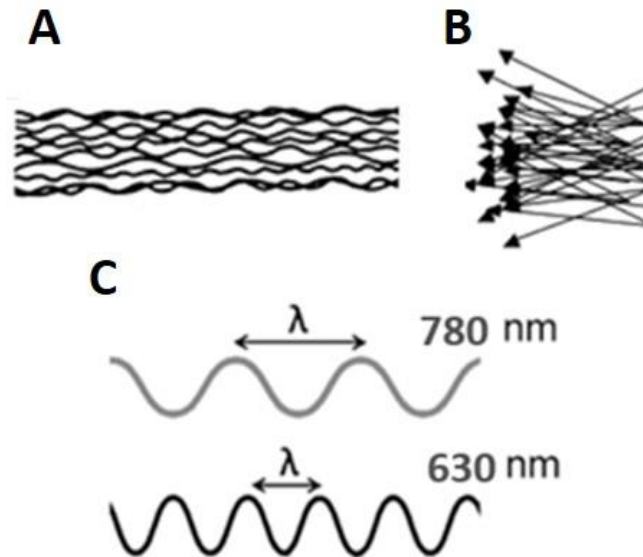


Figura 2 - Aspectos físicos da luz irradiada por LED. (A) Irradiação não coerente do LED, as ondas dos fótons que compõem o feixe de luz não encontram-se em fase. (B) Irradiação não colimada do LED, os fótons propagam-se de maneira desalinhada, não sendo paralelos. (C) Caracterização de diferentes comprimentos de onda. Quanto maior o comprimento de onda, maior a distância entre dois picos de onda. Adaptada de Cidral-Filho (2011) que adaptou de Baxter (2003).

Alguns autores defendem que a coerência da luz é essencial para que os efeitos terapêuticos desejados sejam alcançados (BIHARI e MESTER, 1989; PÖNTINEN *et al.*, 1996). No entanto, em condições fisiológicas, a absorção da luz, de baixa intensidade, pelos sistemas biológicos é naturalmente não coerente, pois a taxa de excitação da decomposição da coerência é muito superior à taxa de fotoexcitação. Ou seja, a coerência fica retida ao longo dos primeiros extratos da pele, antes mesmo que ocorra a absorção da luz pelas moléculas fotorreceptoras especializadas, como a melanina, a porfirina, a hemoglobina e a citocromo c oxidase (KARU, 2003).

Um sistema de luz, pode ser de alta ou baixa intensidade, dependendo do seu nível de excitabilidade, que define o efeito provocado no tecido biológico alvo. Um sistema de alta intensidade (acima de 10 W/cm²) gera energia elevada, podendo romper o tecido, sendo utilizado normalmente como instrumento de corte ou modificação permanente. Os sistemas de alta intensidade têm sido frequentemente utilizados na medicina, em atos cirúrgicos de

extrema precisão e delicadeza, assim como em processos odontológicos e de fisioterapia, possibilitando micro alterações celulares que modificam o curso do seu ciclo vital. Por outro lado, um sistema de baixa intensidade excita em menor proporção as moléculas do tecido biológico alvo, promovendo, dependendo da dose (J/cm^2), bioestimulação ou bioinibição, em relação às reações bioquímicas e fisiológicas das células irradiadas. Os sistemas de baixa intensidade têm sido utilizados especialmente para fins fototerápicos (POSTEN *et al.*, 2005; BAGNATO, 2008).

Nos últimos anos, diversas pesquisas mostraram a aplicabilidade do LED, através de estudos experimentais e clínicos, evidenciando que sua eficácia fotobiomoduladora é semelhante à do laser, que difere por possuir luz monocromática, coerente e colimada, como mostra a revisão feita por Heiskanen e Hamblin, (2018). Nesse contexto, comparado ao laser, o LED terapêutico é mais seguro, podendo ser manuseado pelo próprio paciente em casa. Ademais, ele possibilita a construção de “*clusters*” e apresenta menor gasto de energia, devido a uma maior área emissora de luz, que possibilita a irradiação de grande área corpórea de uma só vez (WHELAN *et al.*, 2001). Além disso, a luz não coerente do LED possui um espectro de ação eletromagnético mais amplo em relação à luz coerente, permitindo interagir com mais fotorreceptores específicos (KARU, 2003).

2.5 PBM: definição e mecanismos de ação

A reação fotobiológica está relacionada à absorção da radiação luminosa com um determinado comprimento de onda por moléculas fotorreceptoras especializadas. Mediante essa absorção, as moléculas adquirem um estado eletronicamente excitado nos processos moleculares primordiais que desencadeiam efeitos biológicos em situações específicas (KARU, 1999). Várias moléculas são capazes de reagir com os fótons: os aminoácidos e ácidos nucleicos absorvem principalmente a radiação no espectro ultravioleta (BAXTER e WAYLONIS, 1995), já os cromóforos absorvem luz no espectro visível, sendo mais comuns a hemoglobina e a melanina (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2003), além de alguns componentes da cadeia respiratória (ou cadeia transportadora de elétrons), principalmente a citocromo c oxidase (KARU, 1999), também conhecida como complexo IV, composta por dois centros heme (A e A3) e dois centros de cobre (Cu_A e Cu_B), capazes de absorver radiação luminosa entre o vermelho e infravermelho (KARU, 2010). Portanto, o termo fotobiomodulação (PBM - *photobiomodulation*, do inglês) refere-se ao mecanismo pelo qual a

luz, na faixa espectral visível e infravermelha, é absorvida por moléculas fotorreceptoras em tecidos biológicos, provocando reações fotofísicas e fotoquímicas, sem causar dano térmico.

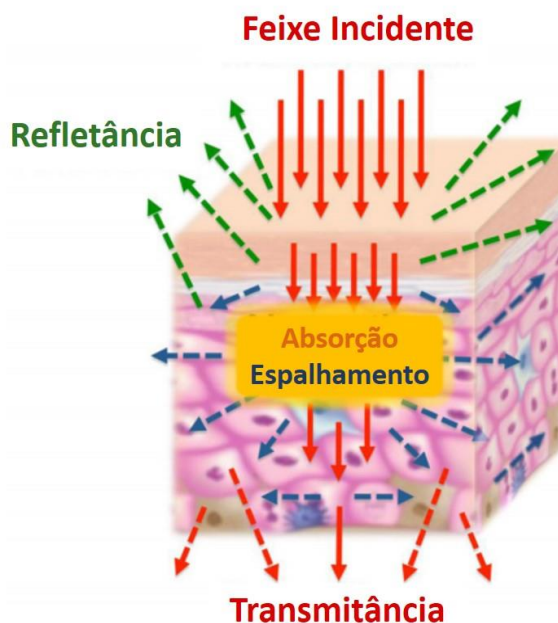


Figura 3 - Propriedades ópticas do tecido irradiado. Adaptada de Sabino *et al.* (2016).

Quando o feixe luminoso é irradiado sobre o tecido vivo, parte da luz sofre reflexão. A proporção de luz refletida depende do comprimento de onda, das características do tecido irradiado e do ângulo de incidência (BAXTER, 2003). A parcela da radiação luminosa que é absorvida pode sofrer espalhamento, que se refere a qualquer mudança na direção da propagação do feixe luminoso e, também, depende do comprimento de onda incidido, da natureza do tecido receptor e do ângulo de incidência do dispositivo (TIPLER, 2000). A porção restante da radiação luminosa, que não é refletida e nem espalhada, é transmitida às moléculas fotorreceptoras especializadas, capazes de serem excitadas pelos fótons incidentes devido às suas configurações eletrônicas ou atômicas (BAXTER e WAYLONIS, 1995). Logo, a transmitância, quantidade de luz absorvida que não sofre espalhamento, é a característica mais relevante para a estimulação do efeito biológico (SABINO *et al.*, 2016) (FIGURA 3).

O comprimento de onda (FIGURA 2C) interfere na transmitância (HAMBLIN e DEMIDOVA, 2006). Estudos apontam a existência de uma “janela óptica” de bioatividade localizada nas regiões espectrais vermelha e próximo à infravermelha (600 a 1200 nm), onde a transmitância é maximizada (HAMBLIN e DEMIDOVA, 2006; KARU, 2010; HAMBLIN, 2017a). Isso ocorre devido à baixa absorção da luz nesses comprimentos de onda pela água,

hemoglobina e melanina (FIGURA 4; HAMBLIN e DEMIDOVA, 2006). Com essa redução do espalhamento, mais luz é capaz de penetrar, alcançando regiões mais profundas do tecido (BAROLET, 2008).

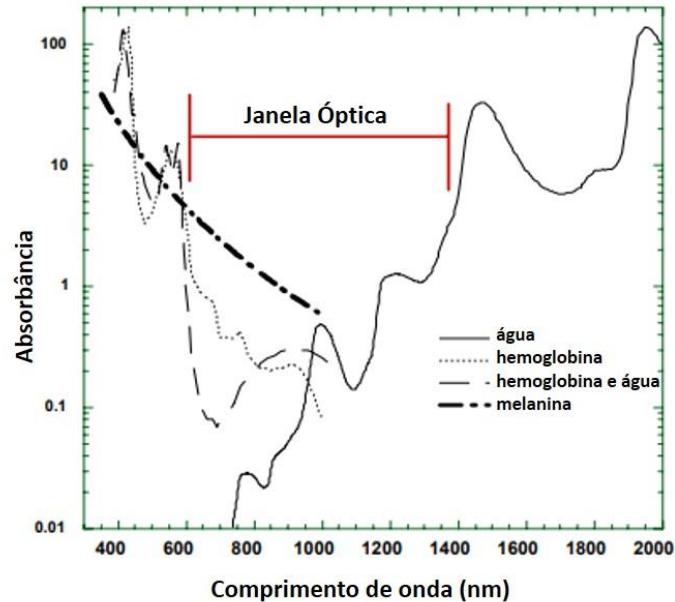


Figura 4 - Janela óptica no tecido biológico. Devido à menor absorção dos comprimentos de onda vermelho e próximo ao infravermelho (600 a 1200 nm) pela água, hemoglobina e melanina, a transmitância é maximizada. Adaptada de Hamblin e Demidova (2006).

Os comprimentos de onda podem ser utilizados separadamente ou em associação. Já foi demonstrado que a combinação de comprimentos de onda distintos pode produzir efeitos diferentes nos tecidos biológicos em comparação aos produzidos por cada um dos comprimentos de onda isoladamente. Esses efeitos positivos podem ser atribuídos a diferentes graus de absorção, porque tecidos superficiais e profundos podem absorver diferentes níveis de radiação (LIMA, SERGIO e FONSECA, 2020).

Outra importante característica da PBM é a “Lei de Arndt-Schultz” (FIGURA 5; BAXTER, 2003). Segundo essa lei, também conhecida como “dose-resposta bifásica”, o aumento da dose, até determinado valor, promove um efeito máximo, inibidor ou estimulador, que desaparece ou leva a danos, caso a dose seja aumentada para além dessa faixa (CHUNG *et al.*, 2012; HAMBLIN, 2017a). Então, além da “janela óptica”, já citada, parece haver uma “janela terapêutica”, onde tratamento é mais efetivo com determinadas doses. Portanto, os efeitos terapêuticos, que exploraremos logo adiante, parecem depender mais do comprimento de onda (HAMBLIN, 2017a) e dose aplicada (ZEIN, SELTING e HAMBLIN, 2018), do que da fonte emissora de luz (HEISKANEN e HAMBLIN, 2018).

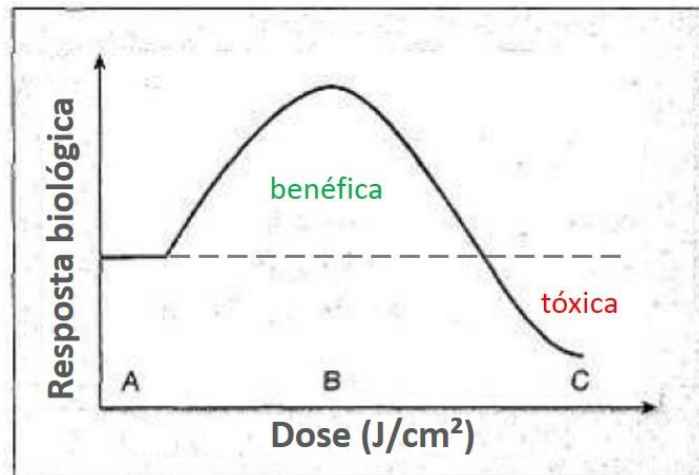


Figura 5 - Lei de Arndt-Shultz ou dose-resposta bifásica. Pré-limiar, sem efeito biológico (A); dose benéfica (B); dose tóxica (C). Adaptada de Baxter (2003).

2.6 PBM na RI e mecanismos subjacentes

Estudos sugerem que a interação entre a molécula fotorreceptora e o feixe luminoso promove a aceleração da transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, através de mudança nas propriedades de oxirredução dos transportadores. Essas evidências apontam ativação ou mudança no potencial de oxirredução de componentes da cadeia respiratória mitocondrial, especialmente quanto à citocromo c oxidase. Ou seja, através da absorção de luz pela enzima citocromo c oxidase, que passa a funcionar como um aceitador de prótons, a PBM promove mudanças e adaptações no metabolismo celular (KARU, 2003).

Segundo Karu (2003), na mitocôndria, a citocromo c oxidase representa uma estrutura-chave na regulação das vias metabólicas, sendo também o principal cromóforo, até então descrito, a absorver a luz vermelha e/ou infravermelha incidente. Sob condições fisiológicas, a atividade da citocromo c oxidase é regulada pelo NO e essa regulação resulta em inibição da respiração mitocondrial. Por sua vez, a ativação fotônica do fluxo de elétrons na molécula citocromo c oxidase pode reverter a inibição parcial do centro catalítico por meio do NO, aumentando também, deste modo, o consumo de O₂. Desta forma, a absorção de luz leva ao aumento da atividade da citocromo c oxidase (HU *et al.*, 2007), deslocando o NO (KARU, PYATIBRAT e AFANASYEVA, 2005) e aumentando a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (BAROLET, 2008). Essa fotodissociação entre o NO e a citocromo c oxidase é uma possível explicação para o fato da PBM parecer exercer maiores efeitos sobre as células

danificadas do que sobre as células saudáveis. Pois as células danificadas ou hipóxicas são mais propensas a terem concentrações inibitórias de NO (HAMBLIN, 2017b).

Outros mecanismos são propostos para explicar os efeitos relevantes da PBM, com comprimento de onda vermelho e infravermelho, sobre as células. Segundo Hamblin (2017a), os canais iônicos de cálcio de potencial receptor transitório (TRP) controlados por calor absorvem luz infravermelha por meio de água estruturada em camadas (também conhecida como água interfacial). Um modelo mais recente traz a interação funcional entre citocromo c (emissor), citocromo c oxidase (dreno) e a camada de água interfacial nanoscópica (portão) entre essas duas enzimas, atuando como um transistor de campo biológico cujo portão é controlado por fótons de luz vermelha ou infravermelha (SOMMER *et al.*, 2020). Considerando que a citocromo c oxidase absorve luz vermelha e infravermelha por meio de seus centros metálicos e que existem vários outros centros metálicos na mitocôndria, não se pode descartar a possível existência de outros cromóforos, ainda não identificados como alvos da PBM, que podem estar envolvidos nos efeitos observados.

Esses mecanismos primários de fotoexcitação induzindo mudanças na citocromo c oxidase são desencadeados pela absorção de luz na mitocôndria. Porém, mesmo após cessar a radiação luminosa efetiva, estes eventos iniciais são seguidos por reações secundárias a nível celular, podendo levar a outras mudanças no estado redox e a modulação das reações bioquímicas, definidas por complexa cascata de sinalização celular, transduzindo e amplificando o sinal fotônico de acordo com os mecanismos primários (KARU, 1999). Assim, as alterações em moléculas sinalizadoras intracelulares, tais como íons cálcio, ROS e fatores de transcrição redox-sensíveis, como o factor nuclear kappa B (NF- κ B), também estão envolvidos na PBM (CHEN *et al.*, 2011).

Quando a PBM estimula a atividade da citocromo c oxidase em células saudáveis, o aumento resultante no potencial de membrana mitocondrial (MMP), acima dos níveis basais normais, leva a um aumento breve e bastante modesto na geração de ROS (CHEN *et al.*, 2009). No entanto, esse breve aumento de ROS causada por 3 J/cm² de laser infravermelho mostrou ser suficiente para NF- κ B, em fibroblastos embrionários (CHEN *et al.*, 2011). Esse aumento na produção de ROS pela PBM pode ser benéfico ou prejudicial, dependendo da taxa em que é gerado. Se a geração de ROS nas mitocôndrias ocorre a uma taxa que permite que a SOD dismute essas espécies reativas em peróxido de hidrogênio, então o H₂O₂ não carregado pode difundir-se para fora das mitocôndrias para ativar vias de sinalização benéficas, enquanto que se a geração de ROS ocorre a uma taxa acima da capacidade da SOD de lidar

com sua produção, então ROS pode acumular-se nas mitocôndrias e danificá-las (HAMBLIN, 2017a).

Apesar da PBM elevar a produção de ROS em células saudáveis, já é bem aceito que no tratamento de lesão tecidual ou dano muscular, ou seja, em células danificadas, a PBM reduz marcadores de desequilíbrio redox (FILLIPIN *et al.*, 2005; DE-MARCHI *et al.*, 2012; TATMATSU-ROCHA *et al.*, 2016). Neurônios corticais primários cultivados foram tratados com uma dentre três intervenções diferentes, todas escolhidas a partir de métodos da literatura de indução artificial de desequilíbrio redox em cultura de células. O primeiro foi o cloreto de cobalto (CoCl₂), que é usado como mimético para hipóxia e funciona por uma reação de Fenton produzindo radicais hidroxila (HERVOUET *et al.*, 2008). O segundo foi o tratamento direto com peróxido de hidrogênio. O terceiro foi o tratamento com o inibidor do complexo mitocondrial, rotenona (MADUNGWE *et al.*, 2016). Todos os três destes diferentes tratamentos aumentaram ROS mitocondriais intracelulares conforme avaliado por *Cell-Rox Red* e, ao mesmo tempo, diminuíram o MMP conforme medido pelo éster metílico de tetrametil rodamina (TMRM). A PBM (3 J/cm², laser infravermelho) elevou o MMP de volta à linha de base, enquanto simultaneamente reduziu a geração de ROS em células com desequilíbrio redox. Em células controle (sem desequilíbrio redox), a PBM aumentou o MMP acima da linha de base e ainda levou a um aumento modesto na geração de ROS (HUANG *et al.*, 2013).

Em síntese, a PBM estimula o aumento da função mitocondrial (SILVEIRA *et al.*, 2019). Com isso, observa-se aumento do consumo de oxigênio, do transporte de elétrons e da produção de ATP (FERRARESI *et al.*, 2015). A PBM também estimula a atividade de enzimas antioxidantes (MARTINS *et al.*, 2016). Concomitantemente, ocorre redução de NO (SANTOS *et al.*, 2020), de ROS (HUANG *et al.*, 2013), do desequilíbrio redox (TATMATSU-ROCHA *et al.*, 2016; HEO *et al.*, 2019) e da ativação de vias inflamatórias (YOSHIMURA, SABINO e RIBEIRO, 2016; SANTOS *et al.*, 2020). Estes efeitos parecem ser mediados pelo aumento da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, à cadeia transportadora de elétrons, síntese de ATP, além de genes antioxidantes e anti-inflamatórios. E por aumentar a atividade da citrato sintase, enzima chave do ciclo de Krebs (VIEIRA *et al.*, 2018), e da citocromo c oxidase, enzima chave da cadeia transportadora de elétrons (HAYWORTH *et al.*, 2010).

Nesse sentido, Ferraresi *et al.*, (2015) mostraram que a PBM, usando a combinação de LED vermelho e infravermelho, foi eficiente em aumentar a síntese de ATP e o potencial de membrana mitocondrial em miotubos C2C12. Em um estudo recente, Silveira

et al., (2019) mostraram que a PBM, com laser vermelho, aumentou a atividade das mitocôndrias do músculo esquelético de ratos adultos, possivelmente, devido à absorção da luz pelos centros metálicos nos complexos da cadeia respiratória, de uma maneira aparentemente dependente da dose e do tempo. Portanto, há evidências *in vitro* e *in vivo* de que a PBM é melhora a função mitocondrial em células musculares esqueléticas.

Considerando que o desenvolvimento da RI parece estar relacionado à disfunção da mitocôndria e que a PBM é eficaz em aumentar a função dessa organela, nosso grupo foi pioneiro em avaliar os efeitos da PBM sobre a via de sinalização intracelular da insulina relacionada ao metabolismo da glicose. No nosso primeiro trabalho, mostramos que a PBM, com laser infravermelho, melhorou a tolerância à glicose em jejum e aumentou a fosforilação de Akt (ser473), AS160 serina 588 (ser588) e o conteúdo de Glut-4 no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com HFD (SILVA *et al.*, 2018). Posteriormente, mostramos que a PBM, com LED vermelho, melhorou tolerância à glicose, RI e hiperinsulinemia em jejum, reduziu o infiltrado inflamatório e aumentou a fosforilação de Akt (ser473), AS160 (ser588) e treonina 642 (thr642) e o conteúdo de Glut-4 no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com HFD (SILVA *et al.*, 2020). Corroborando com nossos achados, Gong *et al.*, (2020) mostraram que a PBM, com laser vermelho, promoveu a ativação da Akt em adipócitos IR-3T3-L1, contribuindo para a redução da RI em modelos de DM2. Em um estudo mais recente, Gong *et al.* (2021) mostraram resultados semelhantes em miotubos IR-L6.

Embora os resultados supracitados mostrem efeitos positivos da PBM sobre a sinalização da insulina e o metabolismo da glicose, há uma lacuna na literatura sobre o comportamento dose-resposta nas células musculoesqueléticas e também sobre os efeitos da combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho sobre a sinalização intracelular da insulina. Além disso, os mecanismos subjacentes precisam ser melhor elucidados. Portanto, no presente estudo, nossos objetivos foram investigar o comportamento dose-resposta e os efeitos da PBM com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, além do efeito do comprimento de onda vermelho isoladamente, sobre a sinalização intracelular da insulina nas células musculoesqueléticas e os mecanismos envolvidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o comportamento dose-resposta e os efeitos da PBM com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, assim como os efeitos do comprimento de onda vermelho isoladamente, sobre a sinalização intracelular da insulina nas células musculoesqueléticas e mecanismos subjacentes.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Experimento 1

- Analisar o efeito da PBM sobre a fosforilação da Akt (ser473) e sobre o conteúdo de HADH e mitofusina-2 em tecido muscular esquelético de camundongos com obesidade.

3.2.2 Experimento 2

- Averiguar o efeito da PBM em diferentes doses sobre a fosforilação da Akt (ser473), o conteúdo de mitofusina-2 e a fosforilação de JNK (thr183/tyr185) em modelo *in vitro* de resistência à insulina;
- Avaliar o efeito da PBM em diferentes doses sobre a atividade máxima da citrato sintase em modelo *in vitro* de resistência à insulina;
- Verificar o efeito da PBM em diferentes doses sobre a peroxidação lipídica, a capacidade antioxidante não enzimática e a atividade da superóxido dismutase em modelo *in vitro* de resistência à insulina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimento 1

No experimento realizado durante o meu mestrado, foi observado que a PBM a longo prazo com laser infravermelho melhorou a tolerância à glicose e a sinalização da via da insulina no tecido adiposo epididimal (SILVA *et al.*, 2018). Foi observado ainda que a PBM a longo prazo com LED vermelho modulou componentes da via da sinalização da insulina também no tecido adiposo epididimal, reverteu a RI e melhorou a tolerância à glicose em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Dando sequência a esse experimento, no presente estudo, foram realizadas análises no tecido muscular esquelético desses roedores e os dados já foram publicados pelo nosso grupo (SILVA *et al.*, 2020).

4.1.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss albino*, com idade inicial de 10 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que foram mantidos, manipulados e eutanasiados de acordo com os princípios adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os camundongos foram acondicionados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), adaptados a ciclo claro/escuro de 12/12 h, à temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, com acesso *ad libitum* à água filtrada e às respectivas dietas. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), protocolo 028/2014 (ANEXO A) e conduzido no Núcleo de Experimentação Animal (NEA) dessa instituição.

4.1.2 Delineamento experimental

Os animais foram aleatoriamente alocados em 2 grupos e receberam dieta controle pobre em gordura (LFC – *low-fat control*, do inglês) ou HFD por 12 semanas. Durante a 8ª semana todos os animais passaram por adaptação ao tratamento SHAM ou PBM. O tratamento, SHAM ou PBM, ocorreu da 9ª a 12ª semana. Quarenta e oito horas após a última sessão de tratamento, os animais foram eutanasiados e foram retirados os tecidos para análises explicitadas adiante. O delineamento experimental está esquematizado na figura 6.



Figura 6 - Delineamento do Experimento 1.

4.1.3 Dietas

Trinta e quatro animais foram divididos aleatoriamente em grupo LFC (n = 16) e HFD (n = 18). O grupo LFC recebeu dieta com baixa concentração de gordura (10% das calorias provenientes de gordura, 20% de proteínas e 70% de carboidratos) e o grupo HFD recebeu dieta hiperlipídica (60% das calorias provenientes de gordura, 20% de proteínas e 20% de carboidratos). O conteúdo de micronutrientes e minerais foi similar entre as duas dietas, como pode ser verificado na tabela 1. Ambas foram produzidas no laboratório semanalmente.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.

Ingrediente	Quantidade (g)	
	<i>Low-fat control (LFC)</i>	<i>High-fat diet (HFD)</i>
Caseína	200,0	200,0
Amido dextrinizado	125,0	125,0
Sacarose (União)	68,8	68,8
Celulose microfina	50,0	50,0
Óleo de soja (Liza)	25,0	25,0
Banha de porco (Sadia)	20,0	245,0
Mix mineral	35,0	35,0
Mix vitaminas	10,0	10,0
L-cistina	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,0	2,0
Amido de milho (Maizena)	506,2	0,0
Total	1045	763,8
kcal/g	3,85	5,24

4.1.4 Adaptação e PBM

Durante a oitava semana de dieta, os animais foram adaptados aos tratamentos SHAM ou PBM, que consistiu na colocação da haste durante quarenta segundos em cada um dos cinco pontos, uma vez ao dia, iniciando sempre às 18 h, ao longo de cinco dias. Porém, a fonte de luz foi mantida desligada e assim os animais não receberam transferência de energia. A partir da nona semana de dieta os animais foram subdivididos em grupos que receberam tratamento SHAM (fonte de luz desligada) ou PBM (LED, 630 ± 20 nm, na faixa espectral vermelha) (Bios Therapy II, Bios). Os grupos foram: LFC-SHAM (n = 8), LFC-PBM (n = 8), HFD-SHAM (n = 9) e HFD-PBM (n = 9).

Para a subdivisão foi realizado um teste intraperitoneal de tolerância à glicose. Os animais permaneceram em jejum por 6 horas e foi injetado intraperitonealmente 1 mg de dextrose (Proquímios) por grama de massa corporal, em solução salina 50% (p/v). Amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda antes (0 minutos) e nos minutos 15, 30, 60, 120 e 180 após a injeção de dextrose (MORTON *et al.*, 2001). A concentração plasmática de glicose foi medida por meio de corte na ponta da cauda com medidor portátil de glicose (Roche, Accu-Chek Performa Nano). A partir desses dados foi plotada curva da concentração plasmática de glicose em função do tempo e calculou-se a área sob a curva. Quanto menor a área sob a curva de glicose maior a tolerância à glicose. Após o teste, foi realizado o pareamento, que resultou nos seguintes valores: LFC-SHAM (média = 41667,7 mg/dL de glicose X 180 min), LFC-PBM (média = 44736,7 mg/dL de glicose X 180 min), HFD-SHAM (média = 71863,4 mg/dL de glicose X 180 min) e HFD-PBM (média = 72558,0 mg/dL de glicose X 180 min), não havendo diferenças consideráveis entre os grupos LFC-SHAM X LFC-PBM (p = 0,83) e HFD-SHAM X HFD-PBM (p = 0,89).

A PBM ocorreu uma vez ao dia, sendo iniciada sempre às 18 h, início do período ativo dos animais, cinco dias por semana, durante quatro semanas (9^a a 12^a semana), totalizando 20 aplicações. Foi realizada em cinco pontos sobre a pele do animal: 1) músculo quadríceps esquerdo e 2) direito, 3) membro superior esquerdo e 4) direito e 5) região central do abdômen (FIGURA 7). Esses pontos foram escolhidos para avaliarmos os efeitos da PBM sobre o tecido adiposo da região abdominal, cujos dados já foram publicados (SILVA *et al.*, 2018), e sobre o tecido muscular esquelético, cujos dados já publicados (SILVA *et al.*, 2018) estão sendo apresentados nesta tese. Os parâmetros utilizados para a PBM estão descritos na tabela 2.

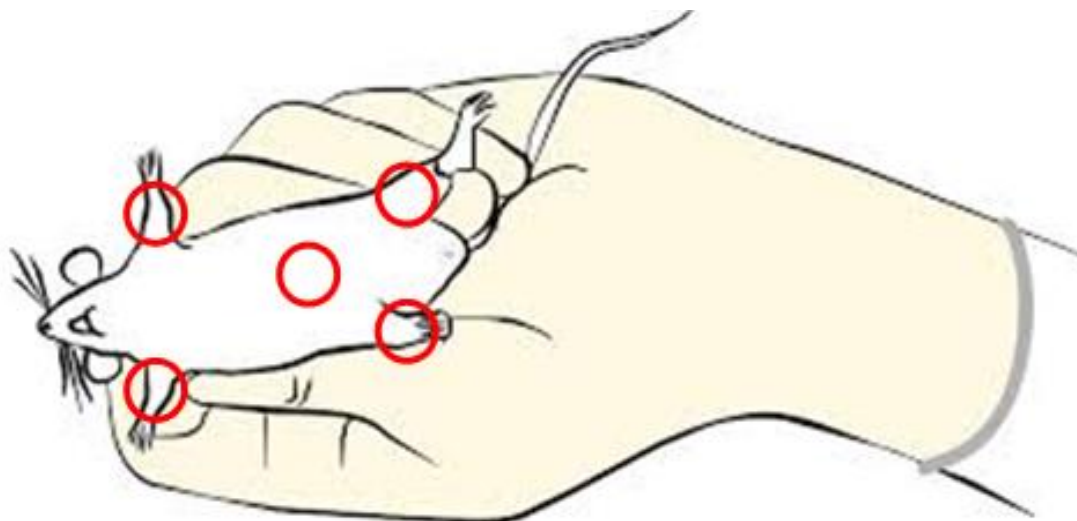


Figura 7 - Pontos de aplicação dos tratamentos SHAM e PBM nos camundongos. Tanto o tratamento SHAM quanto PBM foram aplicados nos membros superiores, inferiores e região central do abdômen. Adaptada de Reis (2016).

Tabela 2 - Parâmetros da PBM nos camundongos.

Comprimento de onda	630 nm
Frequência de pulso	contínua
Modo de aplicação	contato com o animal
Diâmetro da ponteira	7 mm
Área de saída do feixe	0,38 cm ²
Número de pontos de aplicação	5
Tempo de aplicação por ponto	40 s
Potência óptica	300 mW
Densidade de potência óptica (intensidade)	779,53 mW/cm ²
Energia (por ponto/total)	12/60 J
Densidade de energia (dose ou fluência)	31,19 J/cm ²

Durante o experimento, dois animais vieram a óbito por causas desconhecidas, sendo um do grupo LFC-PBM e outro do grupo HFD-SHAM. Assim, o número total foi de 32 camundongos e os grupos seguiram com a seguinte distribuição: LFC-SHAM (n = 8), LFC-PBM (n = 7), HFD-SHAM (n = 8), HFD-PBM (n = 9).

4.1.5 Eutanásia

Quarenta e oito horas após a última sessão de PBM, os animais foram anestesiados com xilazina (Syntec) (10 a 15 mg/kg) mais ketamina (Syntec) (100 a 150 mg/kg). Em seguida, foi injetada via intraperitoneal 15 U de insulina humana regular (Lilly) por kg de massa corporal, para ativação da via da insulina, ou salina no mesmo volume. Dessa forma, a distribuição final dos grupos foi: LFC-SHAM-SALI (n = 4), LFC-SHAM-INS (n = 4), LFC-PBM-SALI (n = 3), LFC-PBM-INS (n = 4), HFD-SHAM-SALI (n = 4), HFD-SHAM-INS (n = 4), HFD-PBM-SALI (n = 4), HFD-PBM-INS (n = 5). Após 15 minutos da injeção, os animais foram eutanasiados através do método físico de deslocamento cervical.

4.1.6 Conteúdo e fosforilação de proteínas

O conteúdo e a fosforilação de proteínas no tecido muscular esquelético foram analisados pela técnica de Western ImunoBlotting. As análises de p-Akt (ser743) e Akt total foram realizadas no Laboratório de Biologia do Exercício e Imunometabolismo (BioEx), na UFVJM. No entanto, devido a problemas com equipamentos necessários para a realização da técnica, as análises de mitofusina-2, HADH e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Endócrina e da Reprodução, na UFMG, em Belo Horizonte/MG, sob a supervisão da Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis.

Amostras de tecido muscular esquelético reto femoral (aproximadamente 50mg) foram homogeneizadas com 200 µL de tampão de lise [triton X100 1% (Thermo Scientific); tris 100 mM, pH 8,0 (Calbiochem); glicerol 20% (Synth) e ácido etilenodiamino tetra-acético 0.2 mM (Synth)], contendo 1 tablete de coquetel inibidor de protease (Roche) e 2 tabletes de coquetel inibidor de fosfatase (Roche) para cada 10 mL de tampão. Os lisados foram centrifugados (Thermo Scientific) a 12000 g, durante 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante contendo as proteínas de interesse foi coletado. A concentração de proteínas totais nos extratos foi determinada pela técnica de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA, 1 mg/mL) (INLAB) como padrão. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices), no comprimento de onda de 595 nm. Os valores de proteína foram determinados pelo *software* Softmaxpro®, em mg/mL.

As amostras foram diluídas na proporção de 3:1 em tampão de amostra 4x [glicerol 50% (Synth); tris 300 mM (Sigma-Aldrich), pH 6,8; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (Merck Millipore); ácido etilenodiamino tetra-acético 60 mM (Synth); azul de bromofenol

0,001% (Synth) e betamercaptoetanol 8% (Spectrum Chemical)] e aquecidas a 95 °C, por 5 minutos. Aproximadamente 30 µg das proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida, constituído pelo gel de empilhamento [solução de acrilamida : bisacrilamida (30%) 42% (Sigma); tris 120 mM, pH 6,8 (Sigma-Aldrich); SDS 0,1% (Synthy); persulfato de amônio 0,075% (Dinâmica) e tetrametiletilenodiamina 0,07% (Bio-Rad)] e gel de separação (solução de acrilamida : bisacrilamida (30%) 16,5% (Sigma); tris 400 mM (Sigma-Aldrich), pH 8,8; SDS 0,1% (Synthy); persulfato de amônio 0,075% (Dinâmica) e tetrametiletilenodiamina 0,07% (Bio-Rad)). Aos géis foram também aplicados 6 µL do padrão de peso molecular (Thermo Scientific). A eletroforese (Bio-Rad) foi realizada por aproximadamente 120 minutos com voltagem entre 50 e 100 volts.

As proteínas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Merck Millipore) previamente ativadas por 5 min em metanol (Êxodo Científica) e equilibradas por 20 min em tampão de transferência [tris 25 mM (Sigma-Aldrich); glicina 192 mM (Calbiochem) e metanol 10% (Dinâmica)]. Para as análises de p-Akt (ser743) e Akt total, a transferência turbo (Bio-Rad) foi realizada em voltagem constante de 25 volts e amperagem máxima de 1,5 miliampères (mA), durante 33 min. Já para as análises de HADH, mitofusina-2 e GAPDH, a transferência *semi-dry* (Bio-Rad) foi realizada em voltagem constante de 15 volts, durante 60 min. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 0,1% (Apacor) para monitoramento da qualidade do procedimento e do padrão de similaridade das bandas. As membranas foram lavadas para retirada do corante e bloqueadas com BSA 10% (INLAB) em tampão contendo tampão tris salina - *tween* (TBS-T) 0,1% [NaCl 5 M (Synth); tris 1 M, pH 7,6 9 (Sigma-Aldrich) e *tween*-20 0,1% (Dinâmica)], por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação leve.

As membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 min com TBS-T 0,1% e encubadas com anticorpos primários [1:1000, diluído em TBS-T 0,1% com BSA 1% (INLAB)] a 4 °C, sob agitação leve, *overnight*. As membranas foram lavadas novamente em TBS-T 0,1%, 3 vezes, 5 minutos, e encubadas por 120 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário [1:5000, diluído em TBS-T 0,1% com BSA 3% (INLAB)] ligado à peroxidase. A relação dos anticorpos utilizados está descrita na tabela 3.

Após três sessões de lavagens por 5 minutos com TBS-T 0,1%, as membranas foram encubadas em solução Luminata Forte (Merck Millipore), por 3 minutos. O sinal gerado pelas bandas foi captado por sistema de fotodocumentação (Loccus Biotecnologia), para as análises de p-Akt (ser473) e Akt total, ou por sistema de fotodocumentação (GE Healthcare), para as análises de HADH, mitofusina-2 e GAPDH. A quantificação foi feita

pelo *software* ImageJ (1.45s, Wayne Rasband). A GAPDH foi utilizada como normalizadora para as proteínas analisadas, com exceção da p-Akt (ser473), que foi normalizada pela Akt total. Os valores de conteúdo relativo gerados estão apresentados como unidades arbitrárias.

Tabela 3 - Anticorpos para detecção de proteínas dos camundongos.

Anticorpo	Tipo	Fonte	# Catálogo
Phospho-Akt (Ser473) (193H12)	Monoclonal	Coelho	4058*
Akt (pan) (11E7)	Monoclonal	Coelho	4685*
HADH	Policlonal	Coelho	19828-1-AP**
Mitofusin-2 (D2D10)	Monoclonal	Coelho	9482S*
GAPDH (14C10)	Monoclonal	Coelho	2118*
Anti-rabbit IgG	-	Cabra	7074*

*Cell Signaling. **Proteintech.

4.1.7 Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se o *software* Statistica (v10.0, StatSoft). Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Para comparação entre os grupos utilizou-se a análise de variância com duas fontes de variação: dieta (LFC ou HFD) X tratamento (SHAM ou PBM). Quando detectadas diferenças significantes, os testes foram seguidos do *post-hoc* de Tukey HSD para detecção pontual das diferenças. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão.

4.2 Experimento 2

Objetivando compreender melhor os efeitos da PBM sobre células musculares esqueléticas, foram realizadas também análises em miotubos C2C12, provenientes de camundongos e precursores de músculo esquelético.

4.2.1 Cultura de células C2C12

Primeiramente, foi realizado treinamento para desenvolvimento e manutenção de cultura de células C2C12, com a equipe de pesquisa do Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira, no *Obesity and Comorbidities Research Center* (OCRC), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em Campinas/SP. Posteriormente, no Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde do Vale do Jequitinhonha (CIPq-Saúde), da UFVJM, os mioblastos, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Leonardo Silveira, foram descongelados e mantidos em 10 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) - *high glucose* (Sigma-Aldrich) com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza), em garrafas de cultura de 75 cm² (Nest) mantidas em estufa (Solab) a 37 °C e 5% de CO₂.

Para não perder a população mioblástica, ao atingirem confluência de 70%, as células, que são aderentes, foram encubadas em tripsina (Sigma-Aldrich) durante 5 min em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, foram centrifugadas a 200 g (Thermo Scientific), durante 5 min. O precipitado foi homogeneizado em 1 mL de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza). As células foram contadas com o auxílio do corante de exclusão Azul de Tripán 0,4% (Êxodo Científica), que distingue as células viáveis (incolores) das células inviáveis (azuis), em câmara de Neubauer (Kasvi), em microscópio invertido (Nova Instruments) e plaqueadas na densidade de 5×10^3 células viáveis/cm² na mesma ou numa nova garrafa esterilizada (Nest) contendo 10 ml de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza). O meio foi trocado a cada 24 horas, para manter seu valor nutritivo, até confluência de 70% das células e novo repique. A cada repique foi contada uma passagem.

Para melhor aproveitamento das células, foi realizada a expansão até a décima sexta passagem, sendo mantidos 12 criotubos de cada passagem. A criopreservação foi feita na proporção de 10^6 células viáveis/mL de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza) suplementado com DMSO 5% (Sigma-Aldrich) e os criotubos de 2 mL (Nest) foram mantidos à -80 °C (Coldlab). Como o DMSO é tóxico para as células à temperatura ambiente, imediatamente após cada descongelamento elas foram centrifugadas (Thermo Scientific) durante 5 min, a 200 g e o *pellet* formado foi homogeneizado em meio de cultura completo.

Os experimentos ocorreram sempre nas mesmas passagens das células, para padronização, sendo essas: décima segunda e décima sexta passagem. Todos os ensaios foram feitos em duplicata experimental, ou seja, com as duas passagens já citadas. Exceto os de parâmetros do estado redox, que foram realizados apenas com a décima segunda passagem. As células foram manipuladas dentro da capela de fluxo laminar (Veco) e todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura (Millipore) e esterilizadas em filtragem a vácuo com membrana de 0,22 μm (Bionaky).

4.2.2 Delineamento experimental

Mioblastos C2C12 foram descongelados e mantidos em 10 mL de meio de cultura, composto por DMEM - *high glucose* (Sigma-Aldrich) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza), em garrafas de cultura de 75 cm^2 (Nest) mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 . Ao atingirem 70% de confluência, foram encubadas em tripsina (Lonza) durante 5 minutos em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 . Em seguida, foram centrifugadas (Thermo Scientific) durante 5 minutos, a 200 *g*. O *pellet* formado foi homogeneizado em 1 mL de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza). As células foram contadas e plaqueadas na densidade de 5×10^3 células viáveis/ cm^2 em 8 placas de 6 poços (Kasvi). Após plaqueamento, os mioblastos foram cultivados em 2 mL de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza), com troca total a cada 24 horas, e mantidos em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 .

Ao atingirem confluência de 100% foi dado o estímulo para diferenciação celular dos mioblastos em miotubos. Após a diferenciação, as células foram encubadas com solução contendo ácido palmítico para a indução da RI e, 24 horas após, ocorreu a PBM. Quinze minutos após a PBM, as células foram encubadas com solução para estímulo da via de sinalização da insulina e, 15 minutos depois, foram extraídas para realização das análises. Portanto, a extração das células para as análises ocorreu 30 minutos após a PBM, como feito no estudo de Gong *et al.* (2020). Esses passos serão detalhados adiante.

A distribuição final dos 16 tratamentos, CTRL-SHAM-PBS, PAL-SHAM-PBS, CTRL-SHAM-INS, PAL-SHAM-INS, CTRL-PBM2-PBS, PAL-PBM2-PBS, CTRL-PBM2-INS, PAL-PBM2-INS, CTRL-PBM4-PBS, PAL-PBM4-PBS, CTRL-PBM4-INS, PAL-PBM4-INS, CTRL-PBM8-PBS, PAL-PBM8-PBS, CTRL-PBM8-INS, PAL-PBM8-INS, em triplicata, está esquematizada na figura 8.

CTRL SHAM PBS	CTRL SHAM PBS	CTRL SHAM PBS
PAL SHAM PBS	PAL SHAM PBS	PAL SHAM PBS

CTRL SHAM INS	CTRL SHAM INS	CTRL SHAM INS
PAL SHAM INS	PAL SHAM INS	PAL SHAM INS

CTRL PBM2 PBS	CTRL PBM2 PBS	CTRL PBM2 PBS
PAL PBM2 PBS	PAL PBM2 PBS	PAL PBM2 PBS

CTRL PBM2 INS	CTRL PBM2 INS	CTRL PBM2 INS
PAL PBM2 INS	PAL PBM2 INS	PAL PBM2 INS

CTRL PBM4 PBS	CTRL PBM4 PBS	CTRL PBM4 PBS
PAL PBM4 PBS	PAL PBM4 PBS	PAL PBM4 PBS

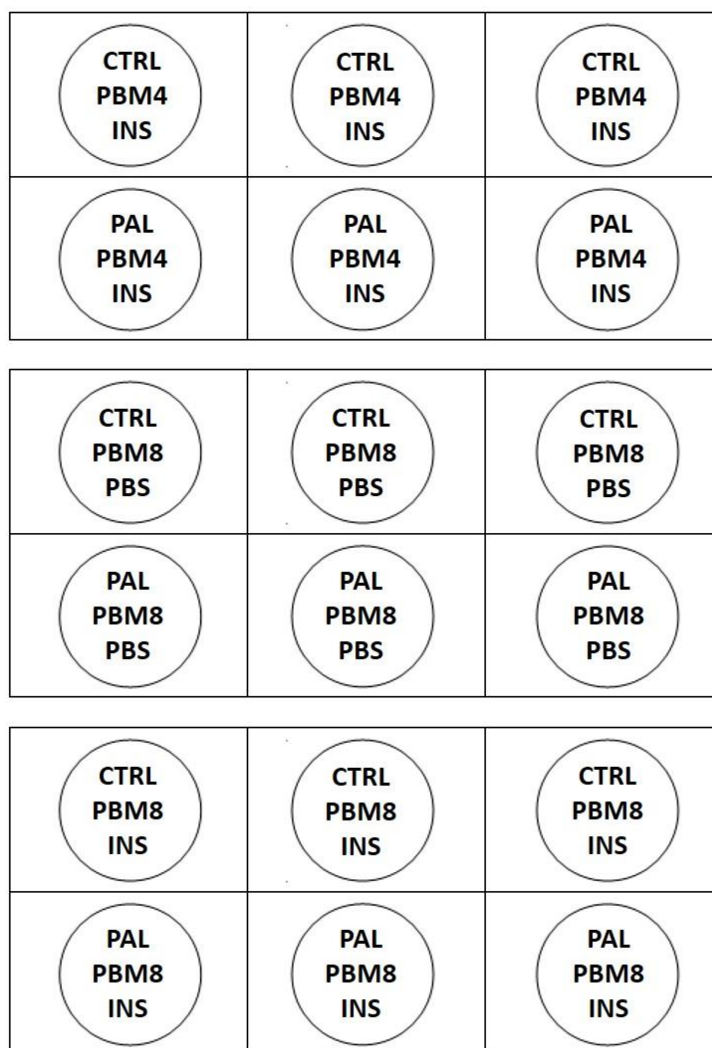


Figura 8 - Esquema de distribuição dos grupos de C2C12 nas placas.

4.2.3 Diferenciação celular

Para a diferenciação celular dos mioblastos, ao atingirem confluência de 100%, o meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza) foi removido e, posteriormente, foi adicionado aos poços 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) (Sigma-Aldrich). Após descarte, foi adicionado o meio de diferenciação, constituído de DMEM - *high glucose* acrescido de 2% soro de cavalo (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza). As células foram mantidas nesse meio, com troca total a cada 24 horas, até ocorrer a diferenciação. A figura 9 (KISLINGER *et al.*, 2005) mostra as mudanças na morfologia celular ao longo do processo de diferenciação.

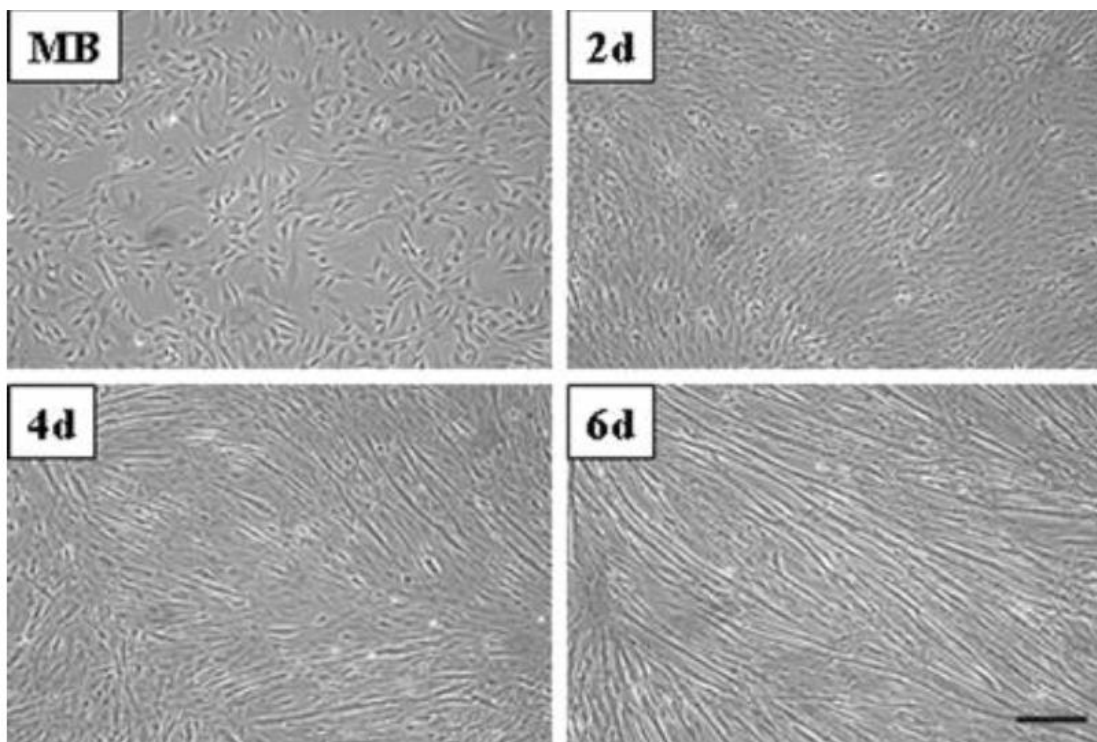


Figura 9 - Mudanças na morfologia celular em resposta à diferenciação miogênica. Imagens baseadas em microscopia de luz de mioblastos (MB) C2C12 indiferenciados em proliferação (dia 0) e células diferenciadas em momentos distintos [dias 2 (2d), 4 (4d) e 6 (6d)]. Barra: 450 μ m (KISLINGER *et al.*, 2005).

4.2.4 Indução da RI

Após a diferenciação dos mioblastos em miotubos, foi preparada solução para indução da RI. Para isso, ácido palmítico (Sigma-Aldrich), oleato de sódio (Sigma-Aldrich) e L-carnitina (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos, separadamente, a uma concentração de 100 mM, sendo o ácido palmítico dissolvido em álcool etílico absoluto (Synth), sob agitação constante, a 50 °C (Solab), e os demais em água ultrapura. Posteriormente, as soluções de ácido palmítico e oleato de sódio foram diluídas a 0,5 mM e a de L-carnitina a 2 mM em meio de diferenciação acrescido de 1% de BSA livre de ácido graxo (Sigma-Aldrich), sob agitação constante (Solab), a 50 °C. Essa concentração de ácido palmítico é eficiente em induzir RI em miotubos C2C12 e a de oleato de sódio em evitar a supressão significativa da viabilidade celular (YANG *et al.*, 2013). A suplementação com L-carnitina é para dar suporte ao transporte desses ácidos graxos de cadeia longa para o interior das mitocôndrias (GASTER *et al.*, 2004). Nos grupos CTRL, foi utilizado o meio de diferenciação acrescido com 1% de BSA livre de ácido graxo apenas. Em seguida, as células foram encubadas (2 mL/poço) durante 24 horas.

4.2.5 PBM

Tendo como objetivo combinar os comprimentos de onda vermelho e infravermelho e aprimorar a aplicação da PBM em cultura de células, um equipamento de LED foi desenvolvido em parceria com o Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) da UFVJM. O processo de desenvolvimento, do esboço até o término da construção, durou cerca de 3 anos. O aparelho foi confeccionado com material de baixo custo e as lâmpadas foram dispostas em *clusters* de 6 LEDs vermelhos (660 nm) e 6 infravermelhos (850 nm) por poço, de modo a iluminar uniformemente todas as células aderidas ao fundo da placa. As luzes são controladas por um painel que permite definir a intensidade de irradiação, optar por utilizar ambos ou apenas um dos comprimentos de onda, definir o tempo e quais poços serão iluminados por vez. Nesse equipamento, o LED é aplicado de baixo para cima (FIGURA 10).

A PBM ocorreu 24 horas após a encubação das células em solução para indução da RI. A parte inferior da placa de 6 poços foi acomodada a uma distância de 2,6 cm das lâmpadas para que a distribuição das luzes vermelha e infravermelha fosse uniforme em cada poço. Os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 4. Esses parâmetros foram calibrados usando um sensor e um medidor de energia óptica (S142C e PM100USB, Thorlabs). Como controle para a PBM, as placas contendo os grupos SHAM foram mantidas durante o mesmo tempo sobre o equipamento, porém sem receberem a incidência de luz.

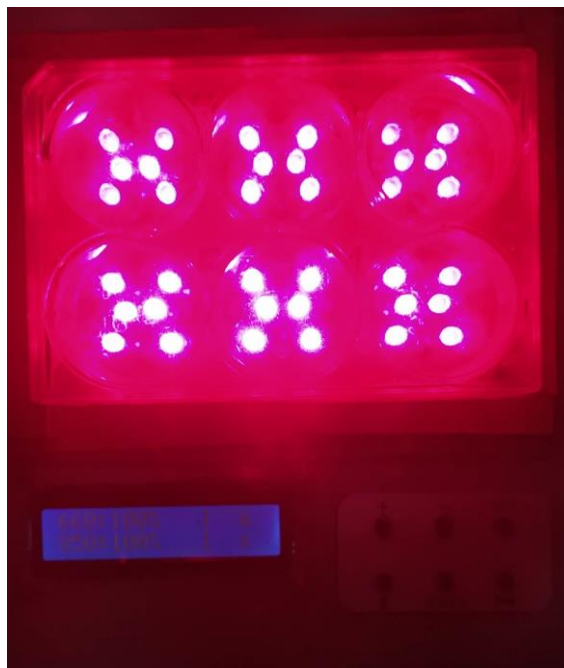


Figura 10 - PBM nos miotubos C2C12. Foi utilizado LED 660 nm (vermelho) e LED 850 nm (infravermelho).

Tabela 4 - Parâmetros da PBM em miotubos C2C12.

Comprimentos de onda	660 nm (vermelho) e 850 nm (infravermelho)
Quantidade de diodos por poço	12 (6 vermelho e 6 infravermelho)
Frequência de pulso	contínua
Modo de aplicação	2,6 cm de distância da placa
Área do sensor (cm ²)	0,71
Potência óptica de chegada no poço (mW) (vermelho/infravermelho)	6,5 / 14
Densidade de potência óptica (intensidade, mW/cm ²) de chegada no poço (vermelho/infravermelho/ total)	9,16 / 19,72 / 28,88
Tempos de aplicação (seg)	69; 139 e 277
Densidades de energia (doses ou fluências, J/cm ²) por comprimento de onda vermelho/infravermelho/total, respectivo ao tempo de aplicação	0,63/1,36/2; 1,27/2,74/4 e 2,54/5,46/8
Área do poço (cm ²)	9,6
Energia (J) por poço por comprimento de onda vermelho/infravermelho/total, respectivo ao tempo de aplicação	6,1/13,1/19,2; 12,2/26,3/38,5 e 24,4/52,4/76,8

Nm – nanometro; cm – centímetro; mW – miliwatt; seg – segundo; J – joule.

Após o tratamento SHAM ou PBM, as células foram recolocadas na estufa por 15 minutos. Em seguida, para ativar a via de sinalização, meio de diferenciação contendo 20 mUI/mL de insulina lispro (Lilly) foi adicionada (2 mL/poço). Como controle para a insulina foi utilizado meio de diferenciação contendo o mesmo volume de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Então, as células permaneceram na

estufa por mais 15 minutos antes da coleta das mesmas para análises, que ocorreu, portanto, 30 minutos após a PBM.

4.2.6 Temperatura durante a aplicação do LED

A placa de 6 poços (Nest), contendo miotubos em meio de diferenciação, foi exposta ao equipamento de LED, usando-se exatamente os mesmos parâmetros definidos para os experimentos com as células, e foi inserido um sensor de multímetro digital (Pol-41, Politerm) dentro do poço, em contato direto com as células e o meio de cultura (FIGURA 11A). Esse processo foi realizado em três poços distintos. No primeiro, o sensor foi mantido encostado no acrílico lateral da parte interna do poço e o tempo de aplicação foi de 69 segundos, no segundo, foi colocado na região central e o tempo de aplicação foi de 139 segundos e, no terceiro, foi posicionado de forma intermediária entre essas duas porções e o tempo de aplicação foi de 277 segundos. A temperatura, em °C, foi exibida no monitor do aparelho (FIGURA 11B). Como mostrado na tabela 5, não foi observada nenhuma alteração igual ou maior a 1 °C.

A**B**

Figura 11 - Aferição da temperatura do poço durante a aplicação do LED. Sensor dentro do poço durante a aplicação do LED (A) e monitor mostrando a temperatura em °C (B).

Tabela 5 - Temperatura durante a aplicação do LED.

Poço - região	Tempo (s)	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Delta (°C)
1 - lateral	69	24	24	0
2 - central	139	24	24	0
3 - intermediária	277	24	24	0

A exposição ao calor está associada ao aumento da biogênese mitocondrial em miotubos C2C12 (LIU e BROOKS, 2012), aumento da biogênese e função mitocondrial no tecido muscular esquelético de humanos (HAFEN *et al.*, 2018), ativação das enzimas mitocondriais no tecido muscular esquelético de ratos (CHEN *et al.*, 1999), melhora da sensibilidade à insulina no tecido muscular esquelético de ratos alimentados com HFD (GUPTE *et al.*, 2009), proteção do tecido muscular esquelético de camundongos alimentados com HFD à RI (CHUNG *et al.*, 2008) e melhora da sensibilidade à insulina no tecido adiposo de mulheres com síndrome do ovário policístico (ELY *et al.*, 2019). E foi devido a tudo isso que realizamos a aferição da temperatura do meio de cultura contendo miotubos aderidos ao fundo da placa durante aplicação do LED. E, como não foi observada variação da temperatura, podemos afirmar que os resultados apresentados mais adiante neste estudo não estão relacionados ao aquecimento do meio de cultura e das células.

4.2.7 Viabilidade celular

O método de exclusão por Azul de Tripán é um ensaio que avalia a citotoxicidade mensurando a viabilidade celular pela integridade da membrana. Em síntese, as células são contadas na câmara de Neubauer, em microscópio invertido, e o corante invade as células inviáveis, corando o citoplasma, devido à perda de seletividade da membrana, enquanto as viáveis permanecem intactas e, portanto, incolores.

Os ensaios ocorreram 30 minutos após a PBM. Para isso, o meio contendo insulina foi removido, os poços foram lavados com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4), as células foram removidas com auxílio *cell scraper*, centrifugadas (Thermo Scientific) durante 5 minutos, a 200 g e ressuspensas em meio de diferenciação. O Azul de Tripán (Dinâmica) foi diluído em água ultrapura à 0,4%, essa solução foi diluída na proporção de 1:1 com cada amostra. Então, 10 µL dessa solução final,

já contendo amostra, foi adicionada à câmara de Neubauer (Kasvi) para a contagem das células viáveis e inviáveis.

Para o cálculo do percentual de células viáveis, o número de células viáveis (não coradas) foi dividido pelo número total de células (coradas e não coradas) e o resultado dessa divisão foi multiplicado por 100. O percentual de células viáveis foi superior a 90% em todos os grupos. Além disso, foi realizada análise de variância com três fontes de variação e não foi observada diferença entre os grupos ($p = 0,84$). Portanto, fica claro que a indução da RI, a PBM e o estímulo com insulina (para ativação da via intracelular desse hormônio) não alteraram a viabilidade dos miotubos C2C12.

4.2.8 Conteúdo e fosforilação de proteínas

O conteúdo e a fosforilação de proteínas nos miotubos C2C12 foi analisada pela técnica de Western ImunoBlotting. Trinta minutos após a PBM, o meio contendo insulina ou PBS foi removido, os poços foram lavados com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), que foi removido em seguida, e foram adicionados 60 μL /poço de tampão de lise [triton X100 1% (Thermo Scientific); tris 100 mM, pH 8,0 (Calbiochem); glicerol 20% (Synth) e ácido etilenodiamino tetra-acético 0.2 mM (Synth)], contendo 1 tablete de coquetel inibidor de protease (Roche) e 2 tabletes de coquetel inibidor de fosfatase (Roche) para cada 10 mL de tampão. Então, foi passado *cell scraper* (Thermo Scientific) em cada poço para remoção das células e todo o volume foi coletado em tubo identificado. Os tubos foram colocados no gelo e cada amostra foi homogeneizada, com pipeta P200 (Labmate), em 6 ciclos, de 20 *up-down* cada. Os lisados foram centrifugados (Thermo Scientific) a 12 000 g, durante 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante contendo as proteínas de interesse foi coletado. A concentração de proteínas totais nos extratos foi determinada pela técnica de Bradford, (1976), utilizando-se BSA (1mg/mL) (INLAB) para construção da curva padrão. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices), no comprimento de onda de 595 nm. Os valores de proteína foram determinados pelo *software* Softmaxpro®, em mg/mL.

As amostras foram diluídas na proporção de 3:1 em tampão de amostra 4x [glicerol 50% (Synth); tris 300 mM (Sigma-Aldrich), pH 6,8; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (Merck Millipore); ácido etilenodiamino tetra-acético 60 mM (Synth); azul de bromofenol 0,001% (Synth) e betamercaptoetanol 8% (Spectrum Chemical)] e aquecidas a 95 °C, por 5 minutos. Aproximadamente 30 μg das proteínas totais foram fracionados em gel de

poliacrilamida, constituído pelo gel de empilhamento [solução de acrilamida : bisacrilamida (30%) 42% (Sigma); tris 120 mM, pH 6,8 (Sigma-Aldrich); SDS 0,1% (Synthy); persulfato de amônio 0,075% (Dinâmica) e tetrametiletilenodiamina 0,07% (Bio-Rad)] e gel de separação (solução de acrilamida : bisacrilamida (30%) 16,5% (Sigma); tris 400 mM (Sigma-Aldrich), pH 8,8; SDS 0,1% (Synthy); persulfato de amônio 0,075% (Dinâmica) e tetrametiletilenodiamina 0,07% (Bio-Rad)). Aos géis foram também aplicados 6 µL do padrão de peso molecular (Thermo Scientific). A eletroforese foi realizada por aproximadamente 120 minutos com uma voltagem entre 50 e 100 volts.

As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Merck Millipore) previamente ativadas por 5 minutos em metanol (Êxodo Científica) e equilibradas por 20 minutos em tampão de transferência [tris 25 mM (Sigma-Aldrich); glicina 192 mM (Calbiochem) e metanol 10% (Dinâmica)]. A transferência *tank blotting* (Bio-Rad) foi realizada a uma voltagem constante de 80 volts, durante 100 minutos (50 minutos, inversão da posição dos cassetes, mais 50 minutos), com a cuba mantida em gelo. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 0,1% (Apacor) para monitoramento da qualidade do procedimento e do padrão de similaridade das bandas. As membranas foram lavadas para retirada do corante e bloqueadas com BSA 10% (INLAB) em tampão contendo tampão TBS-T 0,1% [NaCl 5 M (Synth); tris 1 M, pH 7,6 9 (Sigma-Aldrich) e *tween*-20 0,1% (Dinâmica)], por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação leve.

As membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos com TBS-T 0,1% e encubadas com anticorpos primários [1:1000, diluído em TBS-T 0,1% com BSA 1% (INLAB)] a 4 °C, sob agitação leve, *overnight*. As membranas foram lavadas novamente em TBS-T 0,1%, 3 vezes, 5 minutos, e encubadas por 120 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário [1:5000, diluído em TBS-T 0,1% com BSA 3% (INLAB)] ligado à peroxidase. A relação dos anticorpos utilizados está descrita na tabela 6.

Após três sessões de lavagens por 5 minutos com TBS-T 0,1%, as membranas foram encubadas em solução Luminata Forte (Merck Millipore), por 3 minutos. O sinal gerado pelas bandas foi captado por sistema de fotodocumentação (Loccus Biotecnologia) e a quantificação foi feita pelo *software* ImageJ. A Akt total foi utilizada como normalizadora para a p-Akt (ser473), a GAPDH foi utilizada como normalizadora para a Mitofusin-2 e a JNK total foi utilizada como normalizadora para a p-JNK (thr183/tyr185). Os valores de conteúdo relativo gerados estão apresentados como unidades arbitrárias.

Tabela 6 - Anticorpos para detecção de proteínas dos miotubos C2C12.

Anticorpo	Tipo	Fonte	# Catálogo
Phospho-Akt (Ser473) (193H12)	Monoclonal	Coelho	4058*
Akt (pan) (11E7)	Monoclonal	Coelho	4685*
Mitofusin-2 (D2D10)	Monoclonal	Coelho	9482S*
GAPDH (14C10)	Monoclonal	Coelho	2118*
Phospho-SAPK/JNK (T183/Y185)	Monoclonal	Coelho	9251S*
SAPK/JNK (pan)	Monoclonal	Coelho	9252S*
Anti-rabbit IgG	-	Cabra	7074*

*Cell Signaling.

4.2.9 Atividade máxima da citrato sintase

Para a análise da atividade máxima da citrato sintase nos miotubos C2C12, foram adicionados 100 μ L de tampão de extração [50 mM tris base (Calbiochem) e 1 mM de ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) (Synth), pH 7,4] em tubos contendo 10^6 células. Os tubos foram colocados no gelo e cada amostra foi homogeneizada, com pipeta P200 (Labmate), em 6 ciclos, de 20 *up-down* cada. Os lisados foram centrifugados (Thermo Scientific) a 10000 g, durante 20 minutos, a 4 °C, para separar os resíduos celulares. As alíquotas do sobrenadante foram separadas para dosagem de proteínas totais e para o ensaio enzimático. A atividade máxima da enzima foi determinada segundo protocolo modificado de Alp, Newsholme e Zammit (1976), a partir da quantificação do complexo amarelo formado entre a CoA liberada na reação com ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (reagente de Ellman) presente no tampão de ensaio.

A mistura de ensaio foi constituída por tris base a 10 mM (Calbiochem); DTNB a 0,2 mM (Sigma-Aldrich); acetil-CoA a 0,01 mM (Sigma-Aldrich) e Triton X100 a 1% (v/v) (Thermo Scientific), pH 8,1. A reação foi iniciada com adição de oxaloacetato a 13,2 mM (Sigma-Aldrich) e amostra na solução de ensaio, na proporção de 1:1:18, com volume final de 200 μ L. O método baseia-se na reatividade do DTNB com a CoA-SH, marcando o grupo Tiol (SH), resultando em um composto iônico que absorve luz a 412 nm. Assim, a taxa de formação de CoA-SH pode ser avaliada nesse comprimento de onda. O ensaio foi feito em triplicata de cada amostra e para o cálculo foi utilizada a média dos 3 valores obtidos por amostra. Foi realizado um número de leituras que permitiu visualizar a curva da atividade da

enzima até o ponto máximo da reação, com intervalos de 5 segundos entre elas, na temperatura de 25 °C. A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) (*Comassie blue assay*). Amostra de BSA (1mg/mL) (Sigma-Aldrich) foi utilizada para construção de uma curva com concentrações conhecidas de proteína (curva padrão). A leitura, em triplicata, foi realizada espectrofotometricamente em leitor de microplacas (Molecular Devices), no comprimento de onda de 595nm e os valores de proteína determinados pelo *software* Softmaxpro® em mg/mL. O cálculo da atividade máxima da citrato sintase foi feito utilizando a fórmula
$$\frac{(((ABS\ 2 - ABS\ 1)/(T2-T1)) - ((ABS2' - ABS2')/(T2' - T1')))}{13,6} \times (\text{Vol total ensaio} / \text{Vol amostra}) \times \text{Proteína (mg/ml)} = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$$
. Os valores foram multiplicados por um mil (1000) e os resultados expressos em nmol/min/mg de proteína.

4.2.10 Parâmetros do estado redox

Foram avaliados nos miotubos C2C12 a ocorrência de peroxidação lipídica, a partir da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, do inglês), a capacidade antioxidante não enzimática, determinada pelo poder antioxidante de redução do ferro (FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*, do inglês) e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).

Para a lise das células foi utilizado o método descrito por (GLASS e GERSHON, 1981), com modificações. Em tubos contendo cerca de 10^6 miotubos C2C12 foram adicionados 300 μL de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) contendo 0,2% de Triton 100X (Thermo Scientific). Essa solução passou por 6 ciclos de congelamento-descongelamento e, na sequência, foi centrifugada (Thermo Scientific) a 10000 g, por 15 minutos, a temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante do lisado foi separado em alíquotas para os ensaios: mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); capacidade antioxidante total determinada pelo método FRAP e atividade da SOD.

A reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA) (1,1,3,3-tetrametoxipropano), principal produto da peroxidação lipídica, foi utilizada para determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método descrito por (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Alíquotas do lisado celular (200 μL) foram adicionadas a 125 μL de ácido acético (2,5 M, pH 3,4) (Prolab); 50 μL de SDS

(8,1%) (Merck Millipore) e 125 μL de ácido tiobarbitúrico (0,8%) (Sigma-Aldrich). Essa mistura foi homogeneizada e aquecida a 95 °C durante 90 minutos. Decorrido esse tempo, as amostras foram resfriadas e centrifugadas (Thermo Electron) durante 5 minutos, a 5000 g. O sobrenadante foi analisado, em triplicata, no leitor de microplacas (Molecular Devices) a 532 nm. A concentração de TBARS foi estimada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de MDA (1,1,3,3-tetramethoxypropane - Sigma) como padrão externo. A quantidade de MDA produzida foi interpretada como a concentração de TBARS. Os resultados estão expressos em nmol de MDA/ 10^7 células.

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método FRAP, de acordo com Benzie e Strain (1996). A capacidade de redução do complexo da forma férrico - ferritripiridiltriazina (TPTZ) para a forma ferroso - TPTZ pelos antioxidantes não enzimáticos do lisado celular, em pH ácido, determinam o poder antioxidante da amostra. Para a confecção do reagente FRAP, 25 mL de tampão acetato de sódio (0,3 M, pH 3,6) são acrescentados a 2,5 mL de TPTZ (10 mM) (Sigma-Aldrich) e depois misturados a 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM) (Prolab). A uma alíquota de 528 μL do reagente FRAP foi adicionado 72 μL do sobrenadante celular. Essa mistura foi homogeneizada e incubada no escuro, a 37 °C, por 30 minutos. Depois foi centrifugada (Thermo Electron) a 300 g por 5 min, e o sobrenadante analisado espectrofotometricamente (Molecular Devices) em triplicata, em leitor de microplacas, a 593 nm. A capacidade antioxidante total das amostras foi expressa em equivalentes de Fe^{2+} , determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de sulfato ferroso (FeSO_4) e normalizada pela quantidade de células. Os resultados estão expressos em $\mu\text{M FeSO}_4/10^7$ células.

O ensaio para determinar a atividade da SOD (EC1.15.1.1) foi realizado de acordo com Marklund e Marklund (1974), com algumas modificações. Resumidamente, a 50 μL do lisado celular foram adicionados 150 μL de tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,8) (Prolab) contendo 1 mM de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA - Sigma). As amostras e o tampão foram aquecidos a 37 °C durante 3 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 1 μL de pirogalol a 0,2 mM (Sigma). A leitura foi realizada durante 190 segundos à 37 °C no leitor de microplacas (Molecular Devices), a 420 nm, em duplicata. A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) (*Comassie blue assay*). Amostra de BSA (1mg/mL) (Sigma-Aldrich) foi utilizada para construção de uma curva com concentrações conhecidas de proteínas (curva padrão). A leitura, em triplicata, foi realizada espectrofotometricamente em leitor de microplacas (Molecular Devices), no comprimento de onda de 595nm e os valores de proteína determinados pelo *software*

Softmaxpro® em mg/mL. A atividade da enzima SOD, expressa em U/mg de proteína, é determinada a partir da capacidade da SOD em inibir a autoxidação do pirogalol, onde 1U = 50% de inibição da autoxidação do pirogalol.

4.2.11 Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se o *software* Statistica. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Para comparação entre os grupos utilizou-se a análise de variância com três fontes de variação: meio (CTRL ou PAL) X tratamento (SHAM ou PBM2 ou PBM4 ou PBM8) X estímulo (PBS ou INS). Quando detectadas diferenças significantes, os testes foram seguidos do *post-hoc* de Fisher LSD para detecção pontual das diferenças. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

5.1.1 Conteúdo e fosforilação de proteínas

Os resultados referentes ao Experimento 1, figuras 13, 14 e 15, já foram publicados (SILVA *et al.* 2020). A figura 12 mostra a fosforilação da Akt (ser473) no músculo esquelético reto femoral de camundongos. A estatística foi realizada apenas nos grupos estimulados com insulina, pois não foi possível quantificar a Akt (ser473) nos grupos que receberam salina, como mostrado na imagem representativa dos blots. Houve uma redução na fosforilação da Akt (ser473) em resposta à insulina no grupo HFD-SHAM ($p = 0,02$) em comparação ao grupo LFC-SHAM. Por outro lado, não houve diferença na fosforilação da Akt (ser473) em resposta à insulina no grupo HFD-PBM ($p = 0,33$) em comparação ao grupo LFC-PBM. Logo, a PBM reverteu a redução da fosforilação de Akt (ser473) no músculo esquelético reto femoral, causada pela HFD nos camundongos.

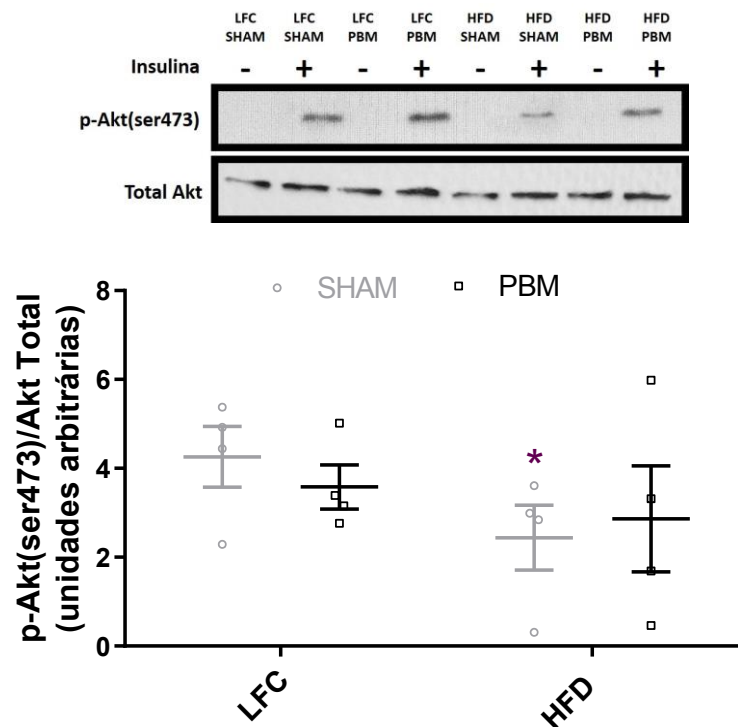


Figura 12 - Fosforilação da Akt (ser473) no músculo reto femoral de camundongos. Efeito da LFC ou HFD e tratamento SHAM ou PBM na fosforilação da Akt (ser473). Solução salina (-) ou insulina (+) foi injetada, por via intraperitoneal, 10 minutos antes da eutanásia. * $p < 0.05$ vs LFC. Grupos: LFC-SHAM ($n = 4$); LFC-PBM ($n = 4$); HFD-SHAM ($n = 4$); HFD-PBM ($n = 4$).

Já a figura 13 mostra o conteúdo de HADH no músculo esquelético reto femoral de camundongos. Observamos que ocorreu um aumento no conteúdo de HADH no grupo HFD-SHAM ($p = 0,01$) em comparação ao grupo LFC-SHAM. Em contrapartida, o conteúdo de HADH do grupo HFD-PBM não foi diferente ($p = 0,37$) em relação ao grupo LFC-PBM e foi menor ($p = 0,01$) quando comparado ao grupo HFD-SHAM. Portanto, a PBM reverteu o aumento no conteúdo de HADH no músculo esquelético reto femoral, causado pela HFD em camundongos.

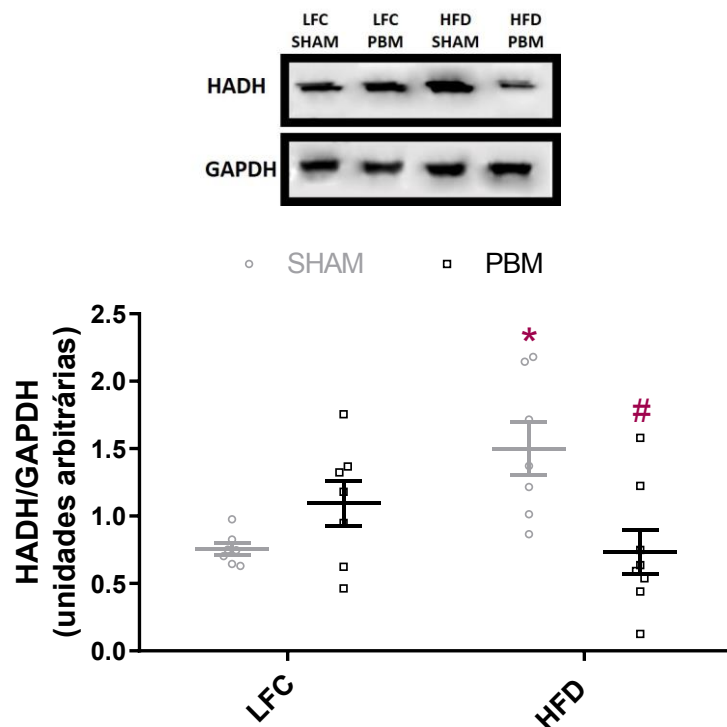


Figura 13 - Conteúdo de HADH no músculo reto femoral de camundongos. Efeito da LFC ou HFD e tratamento SHAM ou PBM no conteúdo de HADH. Solução salina (-) ou insulina (+) foi injetada, por via intraperitoneal, 10 minutos antes da eutanásia. * $p < 0.05$ vs LFC; # $p < 0.05$ vs HFD-SHAM. Grupos: LFC-SHAM ($n = 7$); LFC-PBM ($n = 7$); HFD-SHAM ($n = 7$); HFD-PBM ($n = 8$).

Ainda no presente estudo, a figura 14 mostra o conteúdo de mitofusina-2 no músculo esquelético reto femoral de camundongos. Observamos um aumento no conteúdo de mitofusina-2 no grupo HFD-SHAM ($p = 0,04$) em comparação ao grupo LFC-SHAM. Por outro lado, o conteúdo de mitofusina-2 do grupo HFD-PBM foi menor ($p = 0,01$) em relação ao grupo LFC-PBM e ainda menor ($p = 0,00$) quando comparado ao grupo HFD-SHAM. Portanto, a PBM não apenas reverteu o aumento no conteúdo de mitofusina-2 no músculo esquelético reto femoral, causado pela HFD em camundongos, como diminuiu o conteúdo de mitofusina-2 também em comparação ao grupo LFC.

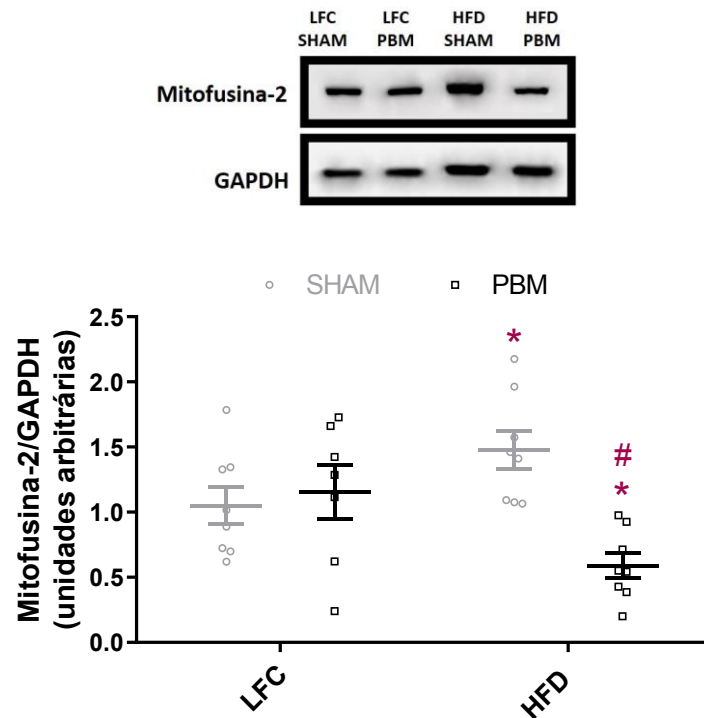


Figura 14 - Conteúdo de mitofusina-2 no músculo reto femoral de camundongos. Efeito da LFC ou HFD e tratamento SHAM ou PBM no conteúdo de mitofusina-2. Solução salina (-) ou insulina (+) foi injetada, por via intraperitoneal, 10 minutos antes da eutanásia. * $p < 0.05$ vs LFC; # $p < 0.05$ vs HFD-SHAM. Grupos: LFC-SHAM (n = 8); LFC-PBM (n = 7); HFD-SHAM (n = 8); HFD-PBM (n = 8).

5.2 Experimento 2

5.2.1 Conteúdo e fosforilação de proteínas

A figura 15 mostra a fosforilação da Akt (ser473) nos miotubos C2C12. Observamos aumento na fosforilação da Akt (ser473) em resposta à insulina nos grupos CTRL-SHAM-INS ($p = 0,00$), CTRL-PBM2-INS ($p = 0,00$), CTRL-PBM4-INS ($p = 0,00$) e CTRL-PBM8-INS ($p = 0,00$) em comparação aos grupos CTRL-SHAM-PBS, CTRL-PBM2-PBS, CTRL-PBM4-PBS e CTRL-PBM8-PBS, respectivamente. Porém, não foram observadas alterações na fosforilação da Akt (ser473) em resposta à insulina nos grupos PAL-SHAM-INS ($p = 0,37$) e PAL-PBM2-INS ($p = 0,56$) em comparação aos grupos PAL-SHAM-PBS e PAL-PBM2-PBS, respectivamente. Em contrapartida, houve aumento na fosforilação da Akt (ser473) em resposta à insulina nos grupos PAL-PBM4-INS ($p = 0,00$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,00$) em comparação aos grupos PAL-PBM4-PBS e PAL-PBM8-PBS, respectivamente. Logo, a fosforilação da Akt (ser473) foi maior nos grupos PAL-PBM4-INS ($p = 0,00$ e $p = 0,00$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,00$ e $p = 0,00$) em comparação aos grupos

PAL-SHAM-INS e PAL-PBM2-INS, respectivamente. Além disso, a fosforilação da Akt (ser473) não foi diferente nos grupos PAL-PBM4-INS ($p = 0,90$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,82$) em comparação aos grupos CTRL-PBM4-INS e CTRL-PBM8-INS, respectivamente. Logo, a PBM nas doses de 4 ou 8 J/cm² reverteu totalmente a redução da fosforilação da Akt (ser473) em resposta à insulina, causada pelo ácido palmítico nos miotubos C2C12.

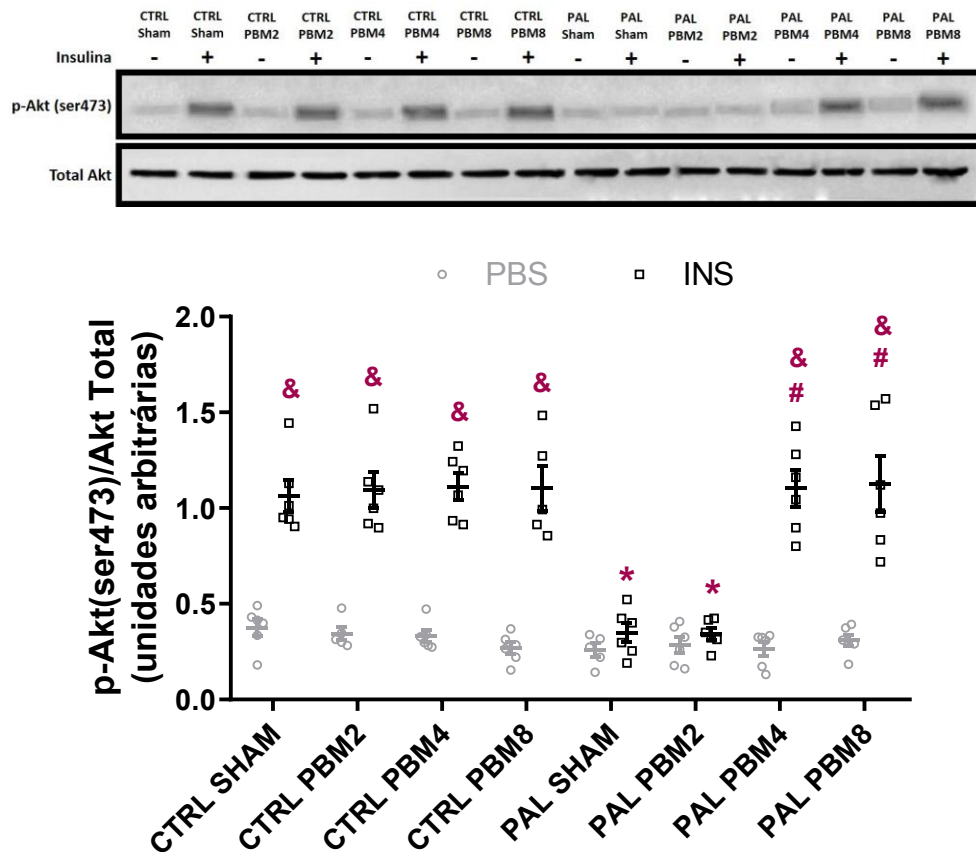


Figura 15 - Fosforilação da Akt (ser473) nos miotubos C2C12. Efeito do meio CTRL ou PAL e tratamento SHAM ou PBM2 ou PBM4 ou PBM8 e estímulo PBS (-) ou INS (+) na fosforilação da Akt (ser473).

* $p < 0.05$ vs CTRL; # $p < 0.05$ vs PAL-SHAM e PAL-PBM2; & $p < 0.05$ vs PBS. Grupos: CTRL-SHAM-PBS ($n=6$); CTRL-SHAM-INS ($n=6$); CTRL-PBM2-PBS ($n=5$); CTRL-PBM2-INS ($n=6$); CTRL-PBM4-PBS ($n=6$); CTRL-PBM4-INS ($n=6$); CTRL-PBM8-PBS ($n=6$); CTRL-PBM8-INS ($n=5$); PAL-SHAM-PBS ($n=5$); PAL-SHAM-INS ($n=6$); PAL-PBM2-PBS ($n=6$); PAL-PBM2-INS ($n=6$); PAL-PBM4-PBS ($n=6$); PAL-PBM4-INS ($n=6$); PAL-PBM8-PBS ($n=6$); PAL-PBM8-INS ($n=6$).

Já a figura 16 mostra o conteúdo de mitofusina-2 nos miotubos C2C12. Observamos aumento no conteúdo de mitofusina-2 nos grupos PAL-SHAM-PBS ($p = 0,00$) e PAL-SHAM-INS ($p = 0,00$) em comparação aos grupos CTRL-SHAM-PBS e CTRL-SHAM-INS, respectivamente. Por outro lado, não houve diferença no conteúdo de mitofusina-2 nos grupos PAL-PBM2-PBS ($p = 0,42$), PAL-PBM2-INS ($p = 0,13$), PAL-PBM4-PBS ($p = 0,24$), PAL-PBM4-INS ($p = 0,13$), PAL-PBM8-PBS ($p = 0,09$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,21$) em

comparação aos grupos CTRL-PBM2-PBS, CTRL-PBM2-INS, CTRL-PBM4-PBS, CTRL-PBM4-INS, CTRL-PBM8-PBS e CTRL-PBM8-INS, respectivamente. Além disso, o conteúdo de mitofusina-2 foi menor nos grupos PAL-PBM2-PBS ($p = 0,00$), PAL-PBM4-PBS ($p = 0,00$) e PAL-PBM8-PBS ($p = 0,00$) em comparação ao grupo PAL-SHAM-PBS e nos grupos PAL-PBM2-INS ($p = 0,00$), PAL-PBM4-INS ($p = 0,00$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,00$) em comparação ao grupo PAL-SHAM-INS. Isso mostra que a PBM nas doses de 2, 4 ou 8 J/cm² reverteu completamente o aumento de mitofusina-2 induzido pelo ácido palmítico nos miotubos C2C12.

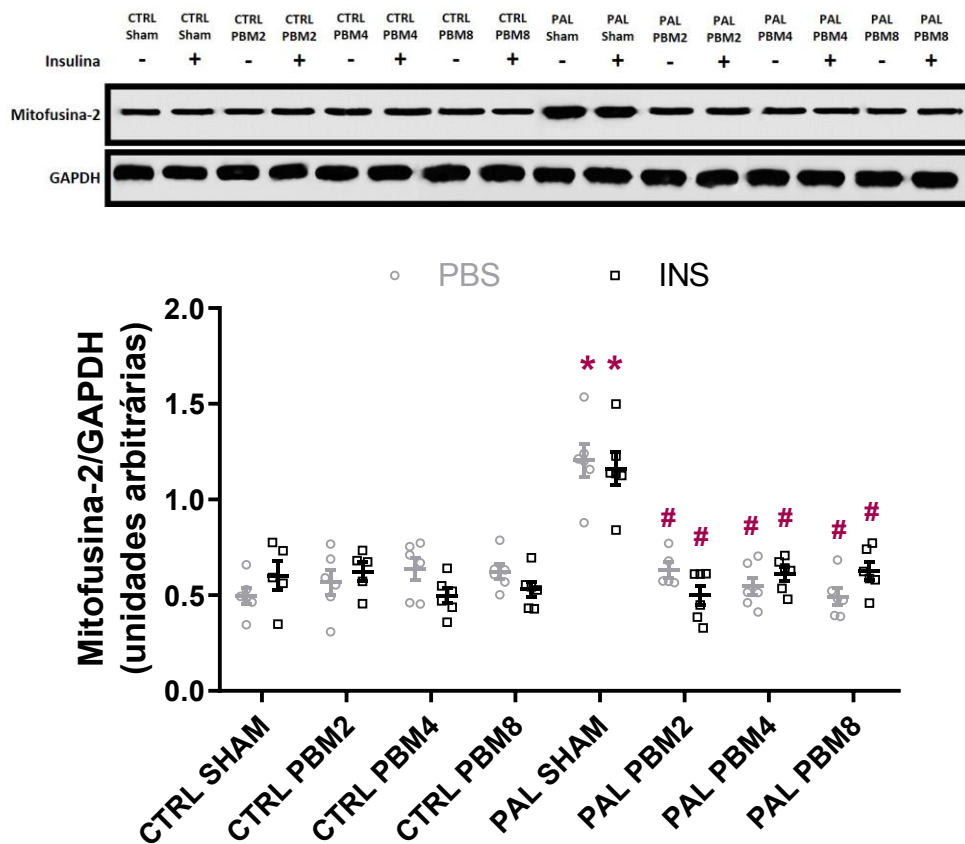


Figura 16 - Conteúdo de mitofusina-2 nos miotubos C2C12. Efeito do meio CTRL ou PAL e tratamento SHAM ou PBM2 ou PBM4 ou PBM8 e estímulo PBS (-) ou INS (+) no conteúdo de mitofusina-2. * $p < 0.05$ vs CTRL; # $p < 0.05$ vs PAL-SHAM. Grupos: CTRL-SHAM-PBS (n=6); CTRL-SHAM-INS (n=5); CTRL-PBM2-PBS (n=6); CTRL-PBM2-INS (n=5); CTRL-PBM4-PBS (n=6); CTRL-PBM4-INS (n=6); CTRL-PBM8-PBS (n=6); CTRL-PBM8-INS (n=6); PAL-SHAM-PBS (n=6); PAL-SHAM-INS (n=6); PAL-PBM2-PBS (n=5); PAL-PBM2-INS (n=6); PAL-PBM4-PBS (n=6); PAL-PBM4-INS (n=6); PAL-PBM8-PBS (n=6); PAL-PBM8-INS (n=6).

Ainda no presente estudo, a figura 17 mostra a fosforilação da JNK (thr183/tyr185) nos miotubos C2C12. Observamos aumento na fosforilação da JNK (thr183/tyr185) nos grupos PAL-SHAM-PBS ($p = 0,00$), PAL-SHAM-INS ($p = 0,00$), PAL-

PBM2-PBS ($p = 0,00$) e PAL-PBM2-INS ($p = 0,00$) em comparação aos grupos CTRL-SHAM-PBS, CTRL-SHAM-INS, CTRL-PBM2-PBS, CTRL-PBM2-INS, respectivamente. Por outro lado, não houve diferença na fosforilação da JNK (thr183/tyr185) nos grupos PAL-PBM4-PBS ($p = 0,26$), PAL-PBM4-INS ($p = 0,26$), PAL-PBM8-PBS ($p = 0,31$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,80$) em comparação aos grupos CTRL-PBM4-PBS, CTRL-PBM4-INS, CTRL-PBM8-PBS e CTRL-PBM8-INS, respectivamente. Além disso, a fosforilação da JNK (thr183/tyr185) foi menor nos grupos PAL-PBM4-PBS ($p = 0,00$ e $p = 0,00$) e PAL-PBM8-PBS ($p = 0,00$ e $p = 0,00$) em comparação aos grupos PAL-SHAM-PBS e PAL-PBM2-PBS, respectivamente, e nos grupos PAL-PBM4-INS ($p = 0,00$ e $p = 0,00$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,00$ e $p = 0,00$) em comparação aos grupos PAL-SHAM-INS e PAL-PBM2-INS, respectivamente. Isso mostra que a PBM nas doses de 4 ou 8 J/cm² reverteu completamente o aumento na fosforilação da JNK induzido pelo ácido palmítico nos miotubos C2C12.

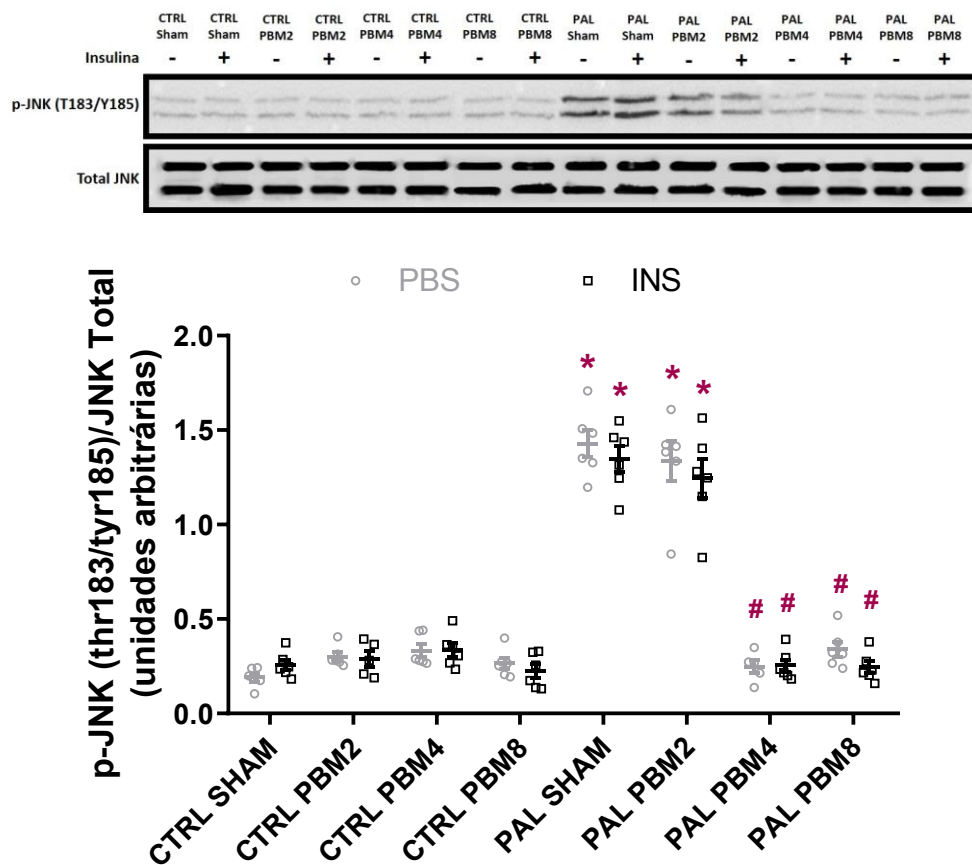


Figura 17 - Fosforilação da JNK (thr183/tyr185) nos miotubos C2C12. Efeito do meio CTRL ou PAL e tratamento SHAM ou PBM2 ou PBM4 ou PBM8 e estímulo PBS (-) ou INS (+) na fosforilação da JNK (thr183/tyr185). * $p < 0,05$ vs CTRL; # $p < 0,05$ vs PAL-SHAM e PAL-PBM2. Grupos: CTRL-SHAM-PBS ($n=6$); CTRL-SHAM-INS ($n=6$); CTRL-PBM2-PBS ($n=6$); CTRL-PBM2-INS ($n=5$); CTRL-PBM4-PBS ($n=6$); CTRL-PBM4-INS ($n=6$); CTRL-PBM8-PBS ($n=6$); CTRL-PBM8-INS ($n=6$); PAL-SHAM-PBS ($n=6$); PAL-SHAM-INS ($n=6$); PAL-PBM2-PBS ($n=6$); PAL-PBM2-INS ($n=6$); PAL-PBM4-PBS ($n=5$); PAL-PBM4-INS ($n=6$); PAL-PBM8-PBS ($n=6$); PAL-PBM8-INS ($n=6$).

5.2.2 Atividade máxima da citrato sintase

A figura 18 mostra os resultados da atividade máxima da citrato sintase nos miotubos C2C12. Observamos aumento na atividade máxima da citrato sintase em resposta à insulina nos grupos CTRL-SHAM-INS ($p = 0,01$), CTRL-PBM2-INS ($p = 0,00$), CTRL-PBM4-INS ($p = 0,00$) e CTRL-PBM8-INS ($p = 0,00$) em comparação aos grupos CTRL-SHAM-PBS, CTRL-PBM2-PBS, CTRL-PBM4-PBS e CTRL-PBM8-PBS, respectivamente. Porém, não foram observadas alterações na atividade máxima da citrato sintase em resposta à insulina nos grupos PAL-SHAM-INS ($p = 0,69$) e PAL-PBM2-INS ($p = 0,65$) em comparação aos grupos PAL-SHAM-PBS e PAL-PBM2-PBS, respectivamente. Em contrapartida, houve aumento na atividade máxima da citrato sintase em resposta à insulina nos grupos PAL-PBM4-INS ($p = 0,00$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,00$) em comparação aos grupos PAL-PBM4-PBS e PAL-PBM8-PBS, respectivamente. Logo, a atividade máxima da citrato sintase foi maior nos grupos PAL-PBM4-INS ($p = 0,00$ e $p = 0,00$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,00$ e $p = 0,00$) em comparação aos grupos PAL-SHAM-INS e PAL-PBM2-INS, respectivamente. Além disso, a atividade máxima da citrato sintase não foi diferente nos grupos PAL-PBM4-INS ($p = 0,92$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,82$) em comparação aos grupos CTRL-PBM4-INS e CTRL-PBM8-INS, respectivamente. Logo, a PBM nas doses de 4 ou 8 J/cm² reverteu totalmente a redução da atividade máxima da citrato sintase em resposta à insulina, causada pelo ácido palmítico.

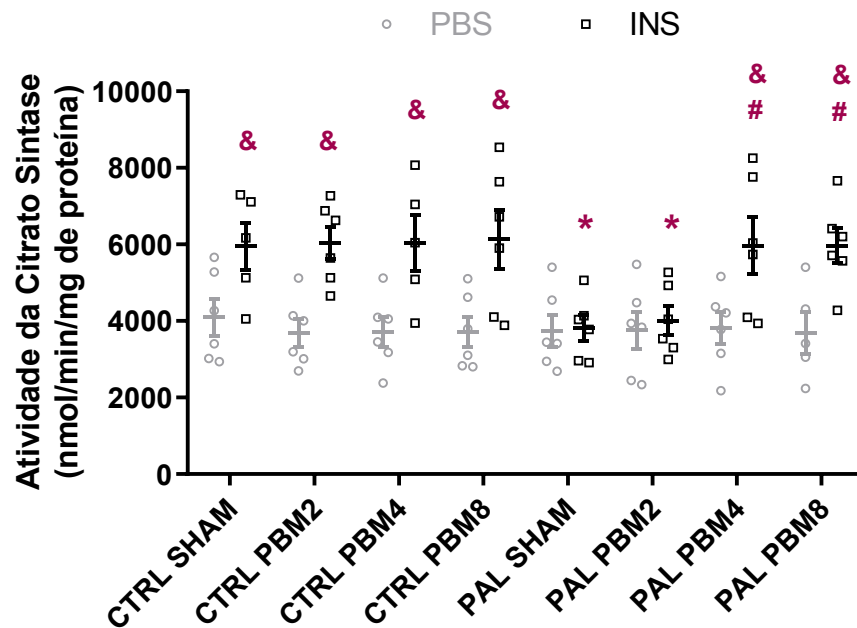


Figura 18 - Atividade máxima da citrato sintase nos miotubos C2C12. Efeito do meio CTRL ou PAL e tratamento SHAM ou PBM2 ou PBM4 ou PBM8 e estímulo PBS (-) ou INS (+) na atividade máxima da citrato sintase. * $p < 0.05$ vs CTRL; # $p < 0.05$ vs PAL-SHAM e PAL-PBM2; & $p < 0.05$ vs PBS. Grupos: CTRL-SHAM-PBS (n=6); CTRL-SHAM-INS (n=5); CTRL-PBM2-PBS (n=6); CTRL-PBM2-INS (n=6); CTRL-PBM4-PBS (n=6); CTRL-PBM4-INS (n=5); CTRL-PBM8-PBS (n=6); CTRL-PBM8-INS (n=6); PAL-SHAM-PBS (n=6); PAL-SHAM-INS (n=6); PAL-PBM2-PBS (n=6); PAL-PBM2-INS (n=6); PAL-PBM4-PBS (n=6); PAL-PBM4-INS (n=6); PAL-PBM8-PBS (n=5); PAL-PBM8-INS (n=6).

5.2.3 Parâmetros do estado redox

A figura 19 mostra a análise da peroxidação lipídica, por meio da concentração de TBARS, nos miotubos C2C12. Houve redução da concentração de TBARS nos grupos CTRL-SHAM-INS ($p = 0,00$) e CTRL-PBM8-INS ($p = 0,00$) em relação aos grupos CTRL-SHAM-PBS e CTRL-PBM8-PBS, respectivamente. Observamos também aumento da concentração de TBARS nos grupos CTRL-PBM8-PBS ($p = 0,00$) e CTRL-PBM8-INS ($p = 0,00$) em relação aos grupos CTRL-SHAM-PBS e CTRL-SHAM-INS, respectivamente. Além disso, o grupo PAL-SHAM-INS apresentou aumento ($p = 0,00$) da concentração de TBARS em relação ao CTRL-SHAM-INS, enquanto o grupo PAL-PBM8-PBS apresentou redução ($p = 0,00$) em comparação ao grupo CTRL-PBM8-PBS.

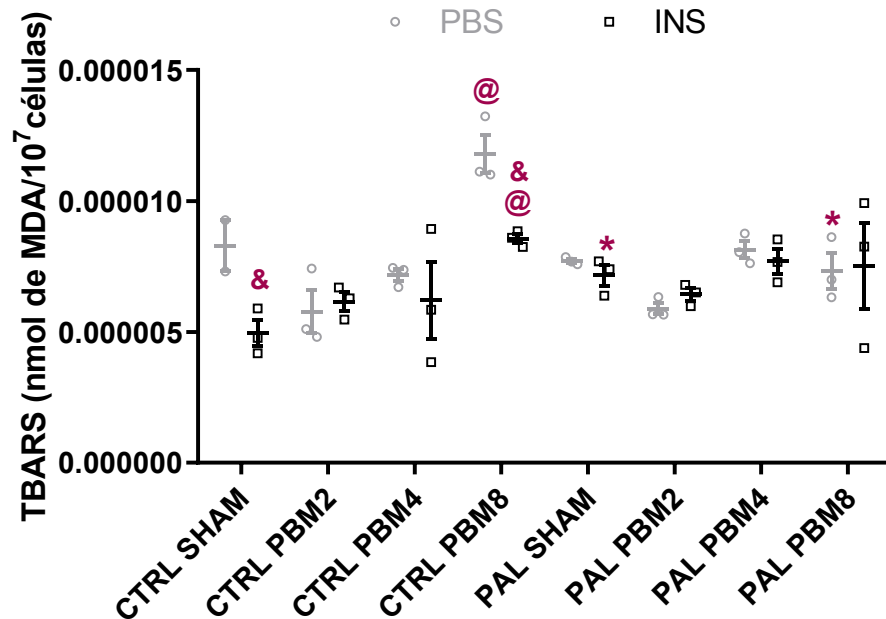


Figura 19 - Análise da peroxidação lipídica nos miotubos C2C12. Efeito do meio CTRL ou PAL e tratamento SHAM ou PBM2 ou PBM4 ou PBM8 e estímulo PBS (-) ou INS (+) na concentração de TBARS. * $p < 0.05$ vs CTRL; @ $p < 0.05$ vs CTRL-SHAM; & $p < 0.05$ vs PBS. Grupos: CTRL-SHAM-PBS (n=1); CTRL-SHAM-INS (n=1); CTRL-PBM2-PBS (n=1); CTRL-PBM2-INS (n=1); CTRL-PBM4-PBS (n=1); CTRL-PBM4-INS (n=1); CTRL-PBM8-PBS (n=1); CTRL-PBM8-INS (n=1); PAL-SHAM-PBS (n=1); PAL-SHAM-INS (n=1); PAL-PBM2-PBS (n=1); PAL-PBM2-INS (n=1); PAL-PBM4-PBS (n=1); PAL-PBM4-INS (n=1); PAL-PBM8-PBS (n=1); PAL-PBM8-INS (n=1).

Já a figura 20 mostra a capacidade antioxidante não enzimática, determinada pelo FRAP, em miotubos C2C12. Os grupos PAL-SHAM-INS ($p = 0,00$) e PAL-PBM4-PBS ($p = 0,04$) apresentaram aumento do FRAP em relação aos grupos CTRL-SHAM-INS e CTRL-PBM4-PBS, respectivamente. Já o grupo PAL-PBM8-INS apresentou redução ($p = 0,05$) do FRAP em relação ao grupo PAL-SHAM-INS. Os grupos PAL-SHAM-PBS, PAL-PBM2-PBM, PAL-PBM2-INS, PAL-PBM4-INS e PAL-PBM8-PBS não apresentaram diferença em relação aos demais ($p > 0,05$).

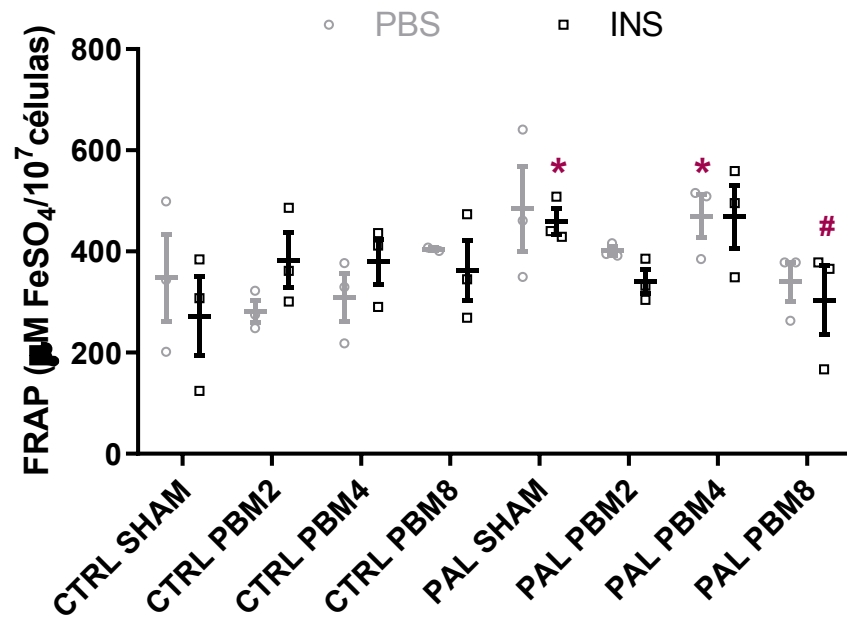


Figura 20 - Capacidade antioxidante não enzimática nos miotubos C2C12. Efeito do meio CTRL ou PAL e tratamento SHAM ou PBM2 ou PBM4 ou PBM8 e estímulo PBS (-) ou INS (+) no FRAP. * $p < 0.05$ vs CTRL; # $p < 0.05$ vs PAL-SHAM e PAL-PBM4. Grupos: CTRL-SHAM-PBS (n=1); CTRL-SHAM-INS (n=1); CTRL-PBM2-PBS (n=1); CTRL-PBM2-INS (n=1); CTRL-PBM4-PBS (n=1); CTRL-PBM4-INS (n=1); CTRL-PBM8-PBS (n=1); CTRL-PBM8-INS (n=1); PAL-SHAM-PBS (n=1); PAL-SHAM-INS (n=1); PAL-PBM2-PBS (n=1); PAL-PBM2-INS (n=1); PAL-PBM4-PBS (n=1); PAL-PBM4-INS (n=1); PAL-PBM8-PBS (n=1); PAL-PBM8-INS (n=1).

Por fim, a figura 21 mostra a atividade da SOD nos miotubos C2C12. Observamos aumento na atividade da SOD nos grupos PAL-SHAM-PBS ($p = 0,00$) e PAL-SHAM-INS ($p = 0,00$) em comparação aos grupos CTRL-SHAM-PBS e CTRL-SHAM-INS, respectivamente. Por outro lado, não houve diferença na atividade da SOD nos grupos PAL-PBM2-PBS ($p = 0,93$), PAL-PBM2-INS ($p = 0,78$), PAL-PBM4-PBS ($p = 0,94$), PAL-PBM4-INS ($p = 0,81$), PAL-PBM8-PBS ($p = 0,91$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,88$) em comparação aos grupos CTRL-PBM2-PBS, CTRL-PBM2-INS, CTRL-PBM4-PBS, CTRL-PBM4-INS, CTRL-PBM8-PBS e CTRL-PBM8-INS, respectivamente. Além disso, a atividade da SOD foi menor nos grupos PAL-PBM2-PBS ($p = 0,00$), PAL-PBM4-PBS ($p = 0,00$) e PAL-PBM8-PBS ($p = 0,00$) em comparação ao grupo PAL-SHAM-PBS e nos grupos PAL-PBM2-INS ($p = 0,00$), PAL-PBM4-INS ($p = 0,00$) e PAL-PBM8-INS ($p = 0,00$) em comparação ao grupo PAL-SHAM-INS. Isso mostra que a PBM nas doses de 2, 4 ou 8 J/cm² reverteu completamente o aumento na atividade da SOD induzido pelo ácido palmítico nos miotubos C2C12.

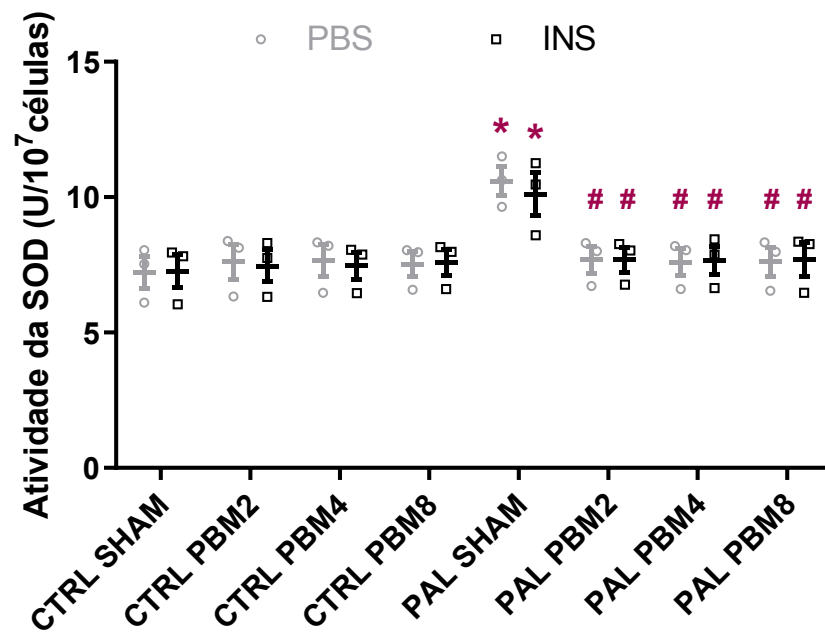


Figura 21 - Atividade da SOD nos miotubos C2C12. Efeito do meio CTRL ou PAL e tratamento SHAM ou PBM2 ou PBM4 ou PBM8 e estímulo PBS (-) ou INS (+) na atividade da enzima superóxido dismutase - SOD. * $p < 0.05$ vs CTRL; # $p < 0.05$ vs PAL-SHAM. Grupos: CTRL-SHAM-PBS (n=1); CTRL-SHAM-INS (n=1); CTRL-PBM2-PBS (n=1); CTRL-PBM2-INS (n=1); CTRL-PBM4-PBS (n=1); CTRL-PBM4-INS (n=1); CTRL-PBM8-PBS (n=1); CTRL-PBM8-INS (n=1); PAL-SHAM-PBS (n=1); PAL-SHAM-INS (n=1); PAL-PBM2-PBS (n=1); PAL-PBM2-INS (n=1); PAL-PBM4-PBS (n=1); PAL-PBM4-INS (n=1); PAL-PBM8-PBS (n=1); PAL-PBM8-INS (n=1).

6 DISCUSSÃO

Este estudo mostra, pela primeira vez, os efeitos da PBM, com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, em diferentes doses, sobre a via de sinalização da insulina. E mostra também os efeitos da PBM sobre a ativação de quinases de estresse, conteúdo e atividade de proteínas mitocondriais e estado redox de células musculares esqueléticas, em modelos de obesidade. A PBM promoveu alterações benéficas tanto *in vivo*, com comprimento de onda vermelho, nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, quanto *in vitro*, com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, nos miotubos C2C12 mantidos em meio contendo ácido palmítico. Nos camundongos, a PBM reverteu a redução da fosforilação da Akt (ser473), o aumento do conteúdo de HADH e de mitofusina-2, induzidos pela HFD no músculo reto femoral. Nas células cultivadas, a PBM nas doses de 4 ou 8 J/cm² reverteu a redução da fosforilação da Akt (ser473) e da atividade máxima da citrato sintase e o aumento da fosforilação da JNK (thr183/tyr185), induzidos pelo ácido palmítico. Além disso, nas doses de 2, 4 ou 8 J/cm², a PBM reverteu o aumento do conteúdo de mitofusina-2 e da atividade da SOD induzidos pelo ácido palmítico nos miotubos C2C12.

O principal achado deste estudo é que, assim como observado por Gong *et al.* (2020) com comprimento de onda vermelho em adipócitos, os efeitos da PBM com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho em células musculoesqueléticas também foram dependentes da dose utilizada. O efeito sobre a ativação da Akt foi observado apenas quando utilizadas as doses de 4 ou 8 J/cm², semelhante ao estudo citado, assim como para os efeitos sobre a atividade máxima da citrato sintase e ativação da JNK. Porém, interessante, os efeitos sobre o conteúdo de mitofusina-2 e atividade da SOD foram observados tanto com as doses de 4 ou 8 J/cm², quanto com a dose menor, de apenas 2 J/cm². Segundo a lei de Arndt-Schultz, doses diminutas não são suficientes para gerar efeitos biológicos relevantes (CHUNG *et al.*, 2012; HAMBLIN, 2017a). Em complemento a essa lei, considerando os resultados do presente estudo, podemos dizer que uma mesma dose, neste caso, a menor, pode promover efeitos sobre alguns parâmetros, mas não ser suficiente para atuar sobre outros.

Além da dose (ZEIN, SELTING e HAMBLIN, 2018), outro importante parâmetro que influencia nos efeitos fotobiológicos é o comprimento de onda (HAMBLIN e DEMIDOVA, 2006). Já foi demonstrado que a combinação de comprimentos de onda distintos pode produzir efeitos diferentes nos tecidos biológicos em comparação aos

produzidos por apenas um comprimento de onda isolado (LIMA, SERGIO e FONSECA, 2020). Em contraste a esses achados, no presente estudo, tanto a PBM com somente o comprimento de onda vermelho, no músculo esquelético dos camundongos, quanto a PBM com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, nos miotubos C2C12, reverteram a deficiência da fosforilação da Akt (ser473) e inibiram o aumento do conteúdo de mitofusina-2, induzidos pela HFD ou pelo ácido palmítico, respectivamente. As demais análises foram realizadas em apenas um dos dois modelos experimentais, não podendo ser comparadas entre eles. Embora todas as análises do presente estudo tenham sido realizadas em células musculoesqueléticas, é importante salientar que o primeiro experimento foi *in vivo*, enquanto o segundo foi *in vitro*. Portanto, essas condições distintas tornam a comparação entre os experimentos limitada. Além disso, por se tratar de alvos diferentes, as doses utilizadas foram distintas, sendo este mais um fator desfavorável à comparação entre os experimentos. Diante disso, são necessários outros estudos, utilizando parâmetros e alvos idênticos, para comparação entre os efeitos da utilização de apenas um comprimento de onda versus a combinação de comprimentos de onda distintos.

Outro resultado importante deste estudo diz respeito a Akt, que é uma enzima chave na sinalização da insulina e prejuízo na sua atividade está associado com redução na captação de glicose, caracterizando o quadro de RI (DANDONA, ALJADA e BANDYOPADHYAY, 2004). De fato, humanos com RI e DM2 apresentam deficiência na ativação da Akt, associada com redução na captação de glicose (KROOK *et al.*, 1998; ZIERATH, KROOK e WALLBERG-HENRIKSSON, 1998; BROZINICK, ROBERTS e DOHM, 2003; KARLSSON *et al.*, 2005; COZZONE *et al.*, 2008; HØJLUND *et al.*, 2009; TONKS *et al.*, 2013). Já foi demonstrado prejuízo na atividade da Akt no músculo esquelético de roedores alimentados com HFD (SHAO *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2001; TREMBLAY *et al.*, 2001) e em células C2C12 tratadas com palmitato (CHAVEZ e SUMMERS, 2003; FENG *et al.*, 2012).

No presente estudo, avaliamos a fosforilação da Akt (ser 473) no músculo esquelético de camundongos e em miotubos C2C12 e, corroborando com estudos supracitados, também observamos redução na ativação dessa proteína em resposta à HFD e ao ácido palmítico, respectivamente. A PBM reverteu essa deficiência na fosforilação da Akt (ser473) causada pela HFD nos camundongos e pelo ácido palmítico nos miotubos C2C12, sugerindo que a sensibilidade à insulina foi reestabelecida em ambas as situações. Portanto, os presentes resultados expandem nosso estudo anterior (SILVA *et al.*, 2018) e mostram que a PBM, com os parâmetros utilizados, reverte a RI não apenas no tecido adiposo, mas também

no músculo esquelético. Esses dados vão ao encontro dos achados de Gong *et al.* (2021), que também observaram aumento da ativação da via da insulina no músculo esquelético, com consequente melhora do metabolismo da glicose, após PBM, com comprimento de onda vermelho, em modelo de camundongo com DM2 e em miotubos IR-L6.

Um dos fatores que podem interferir na sinalização da insulina, em consequência da sobrecarga lipídica, é a ativação de quinases de estresse, como a JNK, que promove a fosforilação de resíduos de serina e treonina do IRS1, inibindo a via (HIROSUMI *et al.*, 2002). Em miócitos cultivados, já foi demonstrado que a RI induzida por palmitato é acompanhada pelo aumento na ativação da JNK (SENN, 2006), enquanto o *knockdown* de JNK atenua a RI induzida por palmitato, (VIJAYVARGIA *et al.*, 2010). Em camundongos e humanos com obesidade, a atividade da JNK também está aumentada no músculo esquelético (HIROSUMI *et al.*, 2002; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2005; CHIANG *et al.*, 2009). Três genes diferentes codificam JNK, sendo estes: JNK 1, 2 e 3 (BARR e BOGOYEVITCH, 2001). Enquanto a expressão de JNK 1 e 2 é difundida, a expressão de JNK 3 ocorre principalmente nos tecidos cardíaco e encefálico (KYRIAKIS, WOODGETT e AVRUCH, 1995). Estudos apontam JNK 1 como a isoforma que mais contribui para o desenvolvimento da RI associada à obesidade, já que camundongos *knockdown* para JNK 1, mas não para JNK 2, são consideravelmente protegidos da obesidade e RI, em modelos de obesidade induzida por dieta e geneticamente (HIROSUMI *et al.*, 2002; TUNCMAN *et al.*, 2006).

Nesta pesquisa, avaliamos a ativação de JNK (1/2) nos miotubos C2C12 e, ao encontro dos estudos supracitados, observamos aumento da ativação em resposta ao ácido palmítico. Esse aumento foi completamente revertido pela PBM nas doses de 4 ou 8 J/cm². Em um estudo anterior, mostramos que a PBM com laser infravermelho atenuou parcialmente a ativação de JNK no tecido adiposo de camundongos alimentados com HFD (SILVA *et al.*, 2018). Mostramos também, em um outro trabalho, que a PBM com LED vermelho reverteu completamente o aumento na ativação de JNK induzido pela HFD no tecido adiposo de camundongos (SILVA *et al.*, 2020). Salehpour *et al.* (2019) mostraram que o estresse de contenção aumentou a ativação de JNK no córtex pré-frontal de camundongos e que a PBM, com comprimento de onda infravermelho, reduziu consideravelmente essa ativação. Portanto, os presentes resultados e a literatura parecem concordar que PBM reduz a ativação de JNK.

Outro fator intimamente associado à RI é a redução da biogênese e função mitocondrial (MONTGOMERY e TURNER, 2015) e a PBM é conhecida por melhorar esses parâmetros (MASHA, HOURELD e ABRAHAMSE, 2013; NGUYEN *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2019). Portanto, investigamos o conteúdo de duas proteínas mitocondriais:

HADH, nos camundongos, e mitofusina-2, nos camundongos e nas células cultivadas. A HADH é uma enzima chave na β -oxidação, onde catalisa a formação de β -cetoacil-CoA a partir de β -L-hidroxiacil-CoA (SCHULZ, 1991). Os resultados mostram que, enquanto a HFD aumentou o conteúdo de HADH, a PBM reverteu esse aumento. Muitos estudos demonstraram que a HFD em camundongos leva ao aumento da capacidade de oxidação de ácidos graxos (MONTGOMERY *et al.*, 2013; DASARI *et al.*, 2018) e o conteúdo de proteínas HADH é elevado nesse contexto (MONTGOMERY *et al.*, 2013; PUTTI *et al.*, 2016). Foi sugerido que a capacidade ampliada de oxidação de ácidos graxos pode refletir uma resposta adaptativa que não compensa completamente a disponibilidade lipídica aumentada, levando ao acúmulo de lipídeos e à RI (MONTGOMERY e TURNER, 2015; LIN *et al.*, 2018). Assim, a redução no conteúdo de HADH no músculo esquelético em resposta à PBM, em camundongos alimentados com HFD, pode ser indicativa de diminuição do acúmulo lipídico devido à reversão da RI (PETERSEN e SHULMAN, 2018).

A morfologia das mitocôndrias está constantemente mudando pelos processos de fusão e fissão (LIU *et al.*, 2014) e o trabalho de Littlejohns *et al.* (2014) mostrou um papel direto da dinâmica mitocondrial na regulação da RI. No presente estudo, observamos que camundongos alimentados com HFD, assim como miotubos mantidos em meio contendo ácido palmítico, apresentaram aumento no conteúdo de mitofusina-2 e que a PBM inibiu completamente o aumento de mitofusina-2 nos dois experimentos.

Os nossos resultados contrastam com os de alguns estudos que mostram redução no conteúdo da proteína mitofusina-2 no músculo esquelético em ratos Zucker obesos (BACH *et al.*, 2005), indivíduos com obesidade e pacientes com DM2 (YU, ROBOTHAM e YOON, 2006) e ratos alimentados com HFD (WYCKELSMA *et al.*, 2017). Por outro lado, e condizente com nossos achados, Littlejohns *et al.* (2014) observaram aumento no conteúdo de mitofusina-2 no tecido cardíaco de camundongos alimentados com HFD, paralelamente à redução da área, comprimento e densidade das mitocôndrias cardíacas. Um outro trabalho, de Wyckelsma *et al.* (2017), avaliou o conteúdo da proteína mitofusina-2 no músculo esquelético de idosos e jovens e observou que o conteúdo de mitofusina-2 estava aumentado nos idosos, embora tenha sido repetidamente demonstrado que o envelhecimento está associado à disfunção mitocondrial e redução do conteúdo mitocondrial (SHORT *et al.*, 2005; WHITE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016). Além disso, os idosos do estudo de Wyckelsma *et al.* (2017) realizaram um protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade por 12 semanas e foi observado um declínio da mitofusina-2, juntamente com um aumento robusto no conteúdo mitocondrial. Os autores especularam que o aumento de mitofusina-2 com o envelhecimento

era uma resposta compensatória à disfunção mitocondrial relacionada ao envelhecimento, e que o declínio de mitofusina-2 observado em resposta ao treinamento físico sugeria que as mitocôndrias estavam se tornando mais funcionais e, portanto, a necessidade de aumentar o conteúdo de proteínas de mitofusina-2 era menor. Assim, um mecanismo semelhante pode explicar os presentes resultados: mitofusina-2 foi aumentada no grupo alimentado com HFD ou mantido em meio contendo ácido palmítico como uma resposta compensatória ao aumento da disfunção mitocondrial. E uma diminuição no conteúdo de mitofusina-2 induzida pela PBM pode ser um indicativo de melhora na função mitocondrial.

Em complemento às análises do conteúdo de HADH e mitofusina-2, avaliamos a atividade máxima da citrato sintase nos miotubos C2C12. A citrato sintase é uma enzima que participa do metabolismo oxidativo e que tem sido utilizada como biomarcador de conteúdo e função mitocondrial (LARSEN *et al.*, 2012; JACOBS *et al.*, 2013). Neste estudo, observamos que a atividade máxima da citrato sintase foi estimulada pela insulina. No entanto, o ácido palmítico prejudicou essa ativação da citrato sintase pela insulina. Porém, a PBM, nas doses de 4 ou 8 J/cm², reverteu completamente o prejuízo na atividade máxima da citrato sintase, causado pelo ácido palmítico, reestabelecendo a resposta dessa enzima à insulina.

O estudo de Ørtenblad *et al.* (2005) também mostrou atividade reduzida da citrato sintase, insensível à estimulação pela insulina, em miotubos estabelecidos a partir de indivíduos com DM2, enquanto a insulina estimulou a atividade da citrato sintase em 26 a 33%, nos miotubos estabelecidos a partir de indivíduos controle magros e com obesidade, sendo que o efeito estimulador da insulina foi abolido por altas concentrações de palmitato. Segundo eles, um mecanismo provável para a alteração na atividade da citrato sintase em resposta à insulina seja a fosforilação/desfosforilação dessa proteína. Eles sugerem também que o aumento de ácidos graxos livres associado à obesidade e ao DM2 pode operar por meio da citrato sintase, contribuindo para a patogênese da resistência à insulina induzida por lipídeos. Porém, o mecanismo preciso pelo qual os ácidos graxos livres inibem a ação da insulina na citrato sintase permanece desconhecido.

Em relação aos efeitos da PBM sobre a citrato sintase, corroborando com os nossos resultados, Aquino *et al.* (2015) observaram aumento na atividade da citrato sintase induzido por PBM, com comprimento de onda infravermelho, no músculo esquelético de ratos. Ao encontro desses achados, o estudo de Vieira *et al.* (2018) também mostrou aumento na atividade da citrato sintase mitocondrial induzido por PBM, com comprimento de onda infravermelho, no músculo esquelético de ratos submetidos ao treinamento aeróbico. Em

conjunto, esses dados mostram que a PBM aumenta a atividade da citrato sintase nas células musculoesqueléticas de camundongos e ratos.

Extrapolando os resultados de HADH do músculo reto femoral dos camundongos para os miotubos C2C12 no presente estudo, podemos dizer que, juntos, os resultados de HADH, mitofusina-2 e citrato sintase, sugerem que a oferta excessiva de lipídeos sobrecarregou a capacidade oxidativa mitocondrial. Na tentativa de lidar com essa situação estressante, as mitocôndrias se adaptaram elevando a β -oxidação, indicada pelo aumento no conteúdo de HADH, e aumentando a dinâmica mitocondrial, mostrada pelo aumento no conteúdo de mitofusina-2. No entanto, essas respostas adaptativas compensaram insuficientemente o aumento da disponibilidade lipídica, levando à RI, inclusive ao nível da citrato sintase. Dessa forma, o ciclo de Krebs parece ter sido um ponto limitante para essas respostas compensatórias. Em contrapartida, a PBM reduziu a RI, provavelmente melhorando a função mitocondrial e reduzindo a lipotoxicidade. Com isso, reestabeleceu a ativação da citrato sintase pela insulina e diminuiu o estímulo que impulsionava o aumento da capacidade oxidativa mitocondrial, refletindo nas reduções no conteúdo de HADH e mitofusina-2. Mais estudos são necessários para confirmar se as alterações observadas na HADH, citrato sintase e mitofusina-2 são traduzidas em alterações na função e na morfologia mitocondrial, respectivamente.

Outra possível explicação para os resultados observados é que, com o aumento no aporte de lipídios e seu transporte para as mitocôndrias, a utilização dos ácidos graxos foi aumentada, haja vista o aumento no conteúdo de HADH e mitofusina-2. Porém, como já citado, o ciclo de Krebs parece ter sido um ponto limitante. Como consequência dessa limitação, pode ter ocorrido elevação na formação de intermediários lipídicos, resultantes da β -oxidação incompleta. Esse acúmulo de intermediários lipídicos, por sua vez, pode ser a causa da RI observada. Em contrapartida, a PBM parece ter modulado o metabolismo mitocondrial, reduzindo o conteúdo de HADH e mitofusina-2 e, conseqüentemente, diminuindo a utilização de ácidos graxos, a β -oxidação incompleta e, portanto, a formação de intermediários lipídicos. Como consequência foi observada melhora na RI.

Mais um fator, resultante do acúmulo de ácidos graxos, que está relacionado com a RI é o desequilíbrio redox (HOUSTIS, ROSEN e LANDER, 2006; RANI *et al.*, 2016) e a PBM pode modular o balanço redox (TATMATSU-ROCHA *et al.*, 2016; HEO *et al.*, 2019). Por isso, analisamos o estado redox a partir da medida da concentração de marcadores de desequilíbrio redox e da atividade antioxidante. A reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico é um estimador confiável da peroxidação lipídica (JANERO, 1990), avaliada pelo ensaio de

TBARS. A peroxidação lipídica ocorre quando radicais livres reagem com moléculas dos ácidos graxos que compõem a membrana celular, gerando danos, comprometendo sua estrutura e funcionalidade, podendo levar à morte celular (HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2007).

Observamos aumento da concentração de TBARS em resposta ao ácido palmítico em miotubos C2C12 que foram encubados com insulina. Em contrapartida, os miotubos C2C12 mantidos em meio contendo ácido palmítico e encubados com insulina que receberam PBM nas doses de 2, 4 ou 8 J/cm² não apresentaram diferença da concentração de TBARS em relação aos seus CTRL. Outro efeito observado neste estudo foi aumento da concentração de TBARS nos grupos CTRL que receberam PBM na dose de 8 J/cm², independente da encubação com insulina. Ou seja, o efeito observado parece realmente ser consequência da PBM na dose mais alta avaliada. Ainda no presente estudo, observamos redução da TBARS em resposta à insulina em dois grupos CTRL. No entanto, devido à limitação do experimento, considerando o n amostral pequeno, esses resultados precisam ser melhor investigados.

Em concordância com nossos achados, Tian *et al.*, (2011) também observaram aumento da concentração de TBARS no músculo sóleo de ratos alimentados com HFD por 12 semanas. Ainda corroborando com nossos resultados, já foi descrito que a PBM, com comprimento de onda infravermelho, mitigou a concentração de TBARS no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos submetidos ao exercício de alta intensidade (FRIGERO *et al.*, 2018). Outro estudo mostrou que a PBM, com comprimento de onda vermelho, reduziu a concentração de TBARS em músculo esquelético desnervado de ratos (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Em conjunto, esses dados mostram o potencial da PBM para reduzir a peroxidação lipídica em diferentes contextos. Segundo a lei de Arndt-Schultz, o aumento da dose promove um efeito máximo até certo ponto, a partir do qual o efeito passa a ser nulo ou prejudicial (CHUNG *et al.*, 2012; HAMBLIN, 2017a). Neste contexto, podemos ponderar que a PBM na dose de 8 J/cm² pode ser danosa para miotubos C2C12 em condições fisiológicas. Porém, para miotubos C2C12 com estresse gerado pela sobrecarga lipídica, em função do ácido palmítico, a dose de 8 J/cm² parece exercer efeitos positivos. Não foram encontrados estudos que tenham relatado alteração de TBARS em resposta à insulina. Portanto, esse achado merece ser melhor investigado em estudos futuros.

Para entendermos melhor o estado redox dos miotubos C2C12, analisamos também a capacidade antioxidante total não enzimática pelo método FRAP (BENZIE e STRAIN, 1996). Curiosamente, observamos aumento do FRAP nos miotubos C2C12, em resposta ao ácido palmítico, tanto no grupo que não recebeu PBM e foi encubado com

insulina quanto no grupo que recebeu PBM na dose de 4 J/cm² e que não foi encubado com insulina. Esse aumento de FRAP em resposta ao ácido palmítico, nos miotubos C2C12 que também foram encubados com insulina, foi completamente revertido pela PBM na dose de 8 J/cm². Contudo, assim como observado para TBARS, tendo em vista o n amostral pequeno, esses resultados de FRAP precisam ser melhor investigados.

De encontro com nossos achados, Ayeleso, Ramachela e Mukwevho (2018) mostraram redução do FRAP em células C2C12 expostas ao palmitato. E um outro estudo mostrou que o FRAP foi inversamente relacionado ao índice de RI (SCHAFT *et al.*, 2019). Destoando dos resultados do presente estudo, Nascimento *et al.* (2021) mostraram que a PBM, com comprimento de onda vermelho, não alterou FRAP no músculo esquelético desnervado de ratos, apesar de melhorar outros parâmetros relacionados ao estado redox. Neste sentido, Martins *et al.* (2021) também mostraram que a PBM, com comprimento de onda vermelho, não alterou o FRAP na cartilagem articular de ratos, em um modelo de osteoartrite de joelho induzida, embora tenham mostrado melhora de outros parâmetros do estado redox pela PBM. E, diferente desses achados e também dos nossos resultados, Amjadi *et al.* (2020) mostraram que a PBM intravenosa, com os comprimentos de onda infravermelho, vermelho, verde ou azul, aumentou FRAP na circulação de ratos diabéticos. E esse aumento foi diretamente proporcional ao tempo de irradiação (2, 4, 6 ou 8 minutos) e inversamente proporcional ao comprimento de onda.

Por fim, avaliamos a atividade da SOD, uma enzima que catalisa a dismutação de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, sendo uma importante defesa antioxidante (POWERS e LENNON, 1999). Embora, valores de SOD circulante sejam questionáveis, pacientes com obesidade apresentam concentrações circulantes mais baixas de SOD, sugerindo um déficit de enzimas antioxidantes citoprotetoras associado à obesidade (OLUSI, 2002; TORKANLOU *et al.*, 2016). No tecido adiposo de camundongos com obesidade grave também foi observada redução tanto na expressão quanto na atividade da isoforma Cu-Zn-SOD (SOD1), presente no citoplasma. Porém, não foram encontradas alterações no músculo esquelético (FURUKAWA *et al.*, 2004). De encontro com esses achados, um estudo mostrou aumento de 84% no conteúdo da isoforma Cu-Zn-SOD (SOD1) no músculo vasto lateral de homens com obesidade (SAMJOO *et al.*, 2013). Portanto, o comportamento da SOD mediante a obesidade, desde a expressão até a atividade, parece variar dependendo da espécie, do tecido ou tipo celular e, também, da isoforma analisada.

Corroborando com o estudo de Samjoo *et al.* (2013), no presente estudo observamos aumento na atividade da SOD nos miotubos C2C12 em resposta ao ácido

palmítico. No entanto, esse aumento na atividade da SOD nos miotubos C2C12 em resposta ao ácido palmítico foi completamente revertido pela PBM nas doses de 2, 4 ou 8 J/cm². Contrastando com nossos resultados, um estudo mostrou que a PBM, com comprimento de onda infravermelho, aumentou a atividade da SOD e de outras enzimas antioxidantes no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos submetidos ao exercício de alta intensidade (FRIGERO *et al.*, 2018).

Uma possível explicação para os efeitos observados no estado redox dos miotubos C2C12, neste estudo, é que o aumento da capacidade antioxidante total não enzimática e da atividade da SOD, em resposta ao ácido palmítico, pode representar uma resposta das células para lidar com o aumento na produção de espécies reativas, indicado pelo aumento da peroxidação lipídica, na busca pelo reestabelecimento do equilíbrio redox. E a reversão desse aumento na capacidade antioxidante total não enzimática e na atividade da SOD, nos miotubos C2C12 tratados com a PBM, especialmente com a dose de 8 J/cm², pode ser um indicativo de que a produção das espécies reativas foi reduzida nessas células fotobiomoduladas, não havendo mais a necessidade de aumentar a capacidade antioxidante total não enzimática e a atividade da SOD na tentativa de compensar a produção aumentada das espécies reativas e de reestabelecer o equilíbrio redox. E isso pode estar relacionado à melhora da atividade metabólica.

Confirmando nossa hipótese, nossos resultados mostram que a PBM com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho melhorou a sinalização intracelular da insulina em células musculares esqueléticas, assim como a PBM com apenas o comprimento de onda vermelho. E isso envolveu a modulação do estado redox e da função mitocondrial, além da atenuação da ativação de quinases de estresse.

7 CONCLUSÃO

A PBM melhorou a sinalização intracelular da insulina nas células musculoesqueléticas em modelos experimentais de obesidade *in vivo* e *in vitro*, tanto com o comprimento de onda vermelho quanto com a combinação dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho. Esses efeitos parecem depender da dose e aparentam estar relacionados a outras alterações promovidas pela PBM, como a modulação do estado redox e da função mitocondrial, além da atenuação da ativação de quinases de estresse.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R. G.; TRESINI, Maria. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00242-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00242-7).

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺ linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**, 1976. <https://doi.org/10.1042/bj1540689>.

AMJADI, A.; MIRMIRANPOUR, H.; GOUDARZI, N. M. Intravenous laser wavelength radiation effect on LCAT PON₁, catalase, and FRAP in diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02805-5><https://doi.org/10.1007/s10103-019-02805-5>.

AQUINO, A. E. J.; SENE-FIORESE, M.; CASTRO, C. A.; DUARTE, F. O.; OISHI, J. C.; SANTOS, G. C.; SILVA, K. A.; FABRIZZI, F.; MORAES, G.; MATHEUS, S. M. M.; DUARTE, A. C. G. O.; BAGNATO, V. S.; PARIZOTTO, N. A. Can low-level laser therapy when associated to exercise decrease adipocyte area? **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.033>.

AVCI, P.; NYAME, T. T.; GUPTA, G. K.; SADASIVAM, M.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy for fat layer reduction: A comprehensive review. **Lasers in Surgery and Medicine**, 2013. <https://doi.org/10.1002/lsm.22153>.

AYELESO, T. B.; RAMACHELA, K.; MUKWEVHO, E. Aqueous-methanol extracts of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas*) ameliorate oxidative stress and modulate type 2 diabetes associated genes in insulin resistant C2C12 cells. **Molecules**, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23082058>

BACH, D.; NAON, D.; PICH, S.; SORIANO, F. X.; VEGA, N.; RIEUSSET, J.; LAVILLE, M.; GUILLET, C.; BOIRIE, Y.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; MANCO, M.; CALVANI, M.; CASTAGNETO, M.; PALACÍN, M.; MINGRONE, G.; ZIERATH, J. R.; VIDAL, H.; ZORZANO, A. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: Effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor α and interleukin-6. **Diabetes**, 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.9.2685>.

BACH, D.; PICH, S.; SORIANO, F. X.; VEGA, N.; BAUMGARTNER, B.; ORIOLA, J.; DAUGAARD, J. R.; LLOBERAS, J.; CAMPS, M.; ZIERATH, J. R.; RABASA-LHORET, R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; LAVILLE, M.; PALACÍN, M.; VIDAL, H.; RIVERA, F.; BRAND, M.; ZORZANO, A.. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: A novel regulatory mechanism altered in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212754200>.

BACKER, J. M.; MYERS JNR., M. G.; SHOELSON, S. E.; CHIN, D. J.; SUN, X. J.; MIRALPEIX, M.; HU, P.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E. Y.; SCHLESSINGER, J.; WHITE, M. F. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO Journal**, 1992. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05426.x>.

BACKER, J. M.; SCHROEDER, G. G.; KAHN, C. R.; MYERS, M. G.; WILDEN, P. A.; CAHILL, D. A.; WHITE, M. F. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, 1992.

BAGNATO, V. S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; SANKARANKUTTY, A. K.; ZUCOLOTO, S.; DE CASTRO E SILVA, O. New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases. An overview of the experimental work performed in collaboration, between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of the University of São Paulo. **Acta Cirurgica Brasileira**, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502006000700002>.

BAGNATO, V. S. Novas Técnicas Ópticas para as áreas da saúde. **Editora Livraria da Física**, 2008.

BAGNATO, V. S. Uso de LEDs (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora. **BR n. PI0200200-0**, 23 jan. 2002.

BANDYOPADHYAY, G.K.; YU, J.G., OFRECIO, J.; OLEFSKY, J.M. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphotylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. **Diabetes**, 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2351>.

BAROLET, D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2008.08.003>.

BARR, R. K.; BOGOYEVITCH, M. A. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). **Int J Biochem Cell Biol**, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00093-0).

BAXTER, C. D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S. (Ed.). **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11ª ed, p. 171-88, Barueri: Manole, 2003.

BAXTER, C. D.; WAYLONIS, G. W. Therapeutic Lasers. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, 1995. <https://doi.org/10.1097/00002060-199507000-00013>.

BELCHIOR-BEZERRA, M; LIMA, R. S.; MEDEIROS, N. I.; GOMES, J. A. S. COVID-19, obesity, and immuneresponse 2 years after the pandemic: A timeline of scientificadvances. **Obesity Reviews**, 2022. <https://doi.org/10.1111/obr.13496>.

BENZIE, Iris F.F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

BIHARI, I.; MESTER, A. R. The biostimulative effect of low level laser therapy of long-standing crural ulcers using helium neon laser, helium neon plus infrared lasers, and noncoherent light: Preliminary report of a randomized double blind comparative study. **Laser Therapy**, 1989. .

BLOUET, C.; MARIOTTI, F.; MIKOGAMI, T.; TOME, D.; HUNEAU, J. F. Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.10.002>.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDER, A.; RONALD-KAHN, C. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2014. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. Vigitel Brasil 2021: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2021 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2022.

BROWN, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00238-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00238-3).

BROWN, H.; DEMPSEY, C. Choosing the right insulin regimen for optimum control. **Community nurse**, 2000. .

BROZINICK, J. T.; ROBERTS, B. R.; DOHM, G. L. Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: Potential role in insulin resistance. **Diabetes**, 2003. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.4.935>.

CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win? 2019. **Advances in Nutrition** [...]. [S. l.: s. n.], 2019. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy055>.

CAI, D.; DHE-PAGANON, S.; MELENDEZ, P. A.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. **Journal of Biological Chemistry**, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212430200>.

CATENACCI, V. A.; WYATT, H. R. The role of physical activity in producing and maintaining weight loss. **Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism**, 2007. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0554>.

CHATTOPADHYAY, M.; KHEMKA, V. K.; CHATTERJEE, G.; GANGULY, A.; MUKHOPADHYAY, S.; CHAKRABARTI, S. Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes

subjects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2236-7>.

CHAURASIA, B.; SUMMERS, S. A. Ceramides-Lipotoxic inducers of metabolic disorders. **Trends Endocrinol. Metab.**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.006>.

CHAVEZ, J. A.; SUMMERS, S. A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.020>.

CHEN, A. C. H.; ARANY, P. R.; HUANG, Y. Y.; TOMKINSON, E. M.; SHARMA, S. K.; KHARKWAL, G. B.; SALEEM, T.; MOONEY, D.; YULL, F. E.; BLACKWELL, T. S.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy activates NF- κ B via Generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PLoS One** 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022453>.

CHEN, A. C. H.; HUANG, Y. Y.; ARANY, P. R.; HAMBLIN, M. R. Role of reactive oxygen species in low level light therapy. **Proc of SPIE**, 2009. <https://doi.org/10.1117/12.814890>.

CHEN, H. W.; CHEN, S. C.; TSAI, J. L.; YANG, R. C. Previous hyperthermic treatment increases mitochondria oxidative enzyme activity and exercise capacity in rats. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, 1999. <https://doi.org/10.6452/KJMS.199910.0572>.

CHEN, S.; WASSERMAN, D. H.; MACKINTOSH, C.; SAKAMOTO, K. Mice with AS160/TBC1D4-Thr649Ala knockin mutation are glucose intolerant with reduced insulin sensitivity and altered GLUT4 trafficking. **Cell Metabolism**, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.005>.

CHEN, T. C.; BENJAMIN, D. I.; KUO, T.; LEE, R. A.; LI, M. L.; MAR, D. J.; COSTELLO, D. E.; NOMURA, D. K.; WANG, J. C. The glucocorticoid-Angptl4-ceramide axis induces insulin resistance through PP2A and PKC ζ . **Sci. Signal.**, 2017. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aai7905>.

CHIANG, S. H.; BAZUINE, B.; LUMENG, C. N.; GELEKTA, L. M.; MOWERS, J.; WHITE, N. M.; MA, J. T.; ZHOU, J.; QI, N.; ESTCOTT, D.; DELPROPOSTO, J. B.; BLACKWELL, T. S.; YULL, F. E.; SALTIEL, A. R. The protein kinase IKK ϵ regulates energy balance in obese mice. **Cell**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.046>.

CHO, H.; MU, J.; KIM, J. K.; THORVALDSEN, J. L.; CHU, Q.; CRENSHAW, E. B.; KAESTNER, K. H.; BARTOLOMEI, M. S.; SHULMAN, G. I.; BIRNBAUM, M. J. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). **Science**, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.292.5522.1728>.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The nuts and bolts of low-level laser (Light) therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0454-7>.

CHUNG, J.; NGUYEN, A. K.; HENSTRIDGE, D. C.; HOLMES, A. G.; CHAN, M. H. S.; MESA, J. L.; LANCASTER, G. I.; SOUTHGATE, R. J.; BRUCE, C. R.; DUFFY, S. J.; HORVATH, I.; MESTRIL, R.; WATT, M. J.; HOOPER, P. L.; KINGWELL, B. A.; VIGH, L.; HEVENER, A.; FEBBRAIO, M. A. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705799105>.

CIDRAL-FILHO, F. J. Terapia por diodo emissor de luz promove antihipersensibilidade, mas falha em acelerar regeneração nervosa após lesão do nervo ciático em camundongos. 2011. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2011. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/94872> >. (Acesso em 16 Ago 2020).

CIPOLAT, S.; DE BRITO, O. M.; DAL ZILIO, B.; SCORRANO, L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>.

CIVITARESE, A. E.; CARLING, S.; HEILBRONN, L. K.; HULVER, M. H.; UKROPCOVA, B.; DEUTSCH, W. A.; SMITH, S. R.; RAVUSSIN, E. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. **PLoS Medicine**, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040076>.

CIVITARESE, A. E.; RAVUSSIN, E. Minireview: Mitochondrial energetics and insulin resistance. **Endocrinology**, 2008. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1444>.

COLETTA, D. K.; MANDARINO, L. J. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance from the outside in: Extracellular matrix, the cytoskeleton, and mitochondria. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2011. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00363.2011>.

COPPS, K. D.; WHITE, M. F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. **Diabetologia**, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>.

COSTA, J. M.; CORRAL-BAQUÉS, M. I.; AMAT, A. Acupuncture: a first approach on pain relief using a 617 nm LED device. 2007. **Mechanisms for Low-Light Therapy II [...]**. [S. l.: s. n.], 2007. <https://doi.org/10.1117/12.724069>.

COZZONE, D.; FRÖJDÖ, S.; DISSE, E.; DEBARD, C.; LAVILLE, M.; PIROLA, L.; VIDAL, H. Isoform-specific defects of insulin stimulation of Akt/protein kinase B (PKB) in skeletal muscle cells from type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0913-8>.

CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochim Biophys Acta**, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>.

CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature Medicine**, 2017. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, Arindam. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.10.013>.

DASARI, S.; NEWSOM, S. A.; EHRLICHER, S. E.; STIERWALT, H. D.; ROBINSON, M. M. Remodeling of skeletal muscle mitochondrial proteome with high-fat diet involves greater changes to β -oxidation than electron transfer proteins in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2018. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00051.2018>.

DAVIS, J. E.; GABLER, N. K.; WALKER-DANIELS, J.; SPURLOCK, M. E. The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes. **Horm. Metab. Res.**, 2009. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1202852>.

DE-MARCHI, T.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; BORTOLI, C.; TOMAZONI, S. S.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; SALVADOR, M. Low-level therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers Med Sci**, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0955-5>.

DUVAL, C.; CÁMARA, Y.; HONDARES, E.; SIBILLE, B.; VILLARROYA, F. Overexpression of mitochondrial uncoupling protein-3 does not decrease production of the reactive oxygen species, elevated by palmitate in skeletal muscle cells. **FEBS Letters**, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.085>.

EELLS, J. T.; WONG-RILEY, M. T.T.; VERHOEVE, J.; HENRY, M.; BUCHMAN, E. V.; KANE, M. P.; GOULD, L. J.; DAS, R.; JETT, M.; HODGSON, B. D.; MARGOLIS, D.; WHELAN, H. T. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.033>.

EIKENBERG, J. D.; DAVY, B. M. Prediabetes: A Prevalent and Treatable, but Often Unrecognized, Clinical Condition. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2012.10.018>.

ELY, X. B. R.; CLAYTON, Z. S.; MCCURDY, X. C. E.; PFEIFFER, J.; NEEDHAM, K. W.; COMRADA, L. N.; MINSON, C. T. Heat therapy improves glucose tolerance and adipose tissue insulin signaling in polycystic ovary syndrome. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2019. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00549.2018>.

ERION, D. M.; SHULMAN, G. I. Diacylglycerol-Mediated insulin resistance. **Nat. Med.**, 2010. <https://doi.org/10.1038/nm0410-400>.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, 1991. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6).

FENG, X. T.; WANG, T. Z.; LENG, J.; CHEN, Y.; LIU, J. B.; LIU, Y.; WANG, W. J. Palmitate contributes to insulin resistance through downregulation of the src-mediated

phosphorylation of Akt in C2C12 myotubes. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 2012. <https://doi.org/10.1271/bbb.120107>.

FERRARESI, C.; KAIPPERT, B.; AVCI, P.; HUANG, Y. Y.; DE SOUSA, M. V.P.; BAGNATO, V. S.; PARIZOTTO, N. A.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. **Photochemistry and Photobiology**, 2015. <https://doi.org/10.1111/php.12397>.

FILLIPIN, L. I.; MAURIZ, J. L.; VEDOVELLI, K.; MOREIRA, A. J.; ZETTLER, C. G.; LECH, O.; MARRONI, N. P.; GONZÁLES-GALLEGO, J. Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. **Lasers in Surgery and Medicine**, 2005. <https://doi.org/10.1002/lsm.20225>.

FRIGERO, M.; SANTOS, S. A.; SERRA, A. J.; MACHADO, C. S. M.; PORTES, L. A.; TUCCI, P. J. F.; SILVA, F.; LEAL-JUNIOR, E. C.; CARVALHO, P. T. C. Effect of photobiomodulation therapy on oxidative stress markers of gastrocnemius muscle of diabetic rats subjected to high-intensity exercise. **Lasers Med Sci.**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2540-7>.

FUJISHIRO, M. et al. Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Endocrinol**, 2003. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0131>.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y., NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, 2004. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>.

GASTER, M.; RUSTAN, A. C.; AAS, V.; BECK-NIELSEN, H. Reduced Lipid Oxidation in Skeletal Muscle from Type 2 Diabetic Subjects May Be of Genetic Origin: Evidence from Cultured Myotubes. **Diabetes**, 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.542>.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BA, G.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(99\)80086-9](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(99)80086-9).

GLASS, G. A.; GERSHON, D. Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: Loss of superoxide dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1981. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)90256-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)90256-4).

GONG, L.; ZOU, Z.; HUANG, L.; GUO, S.; XING, D. Photobiomodulation therapy decreases free fatty acid generation and release in adipocytes to ameliorate insulin resistance in type 2 diabetes. **Cellular Signalling**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109491>.

GONG, L.; ZOU, Z.; HUANG, L.; GUO, S.; XING, D. Photobiomodulation therapy ameliorates hyperglycemia and insulin resistance by activating cytochrome c oxidase-mediated protein kinase B in muscle. **Cellular Signalling**, 2021. <https://doi.org/10.18632/aging.202760>.

GUPTE, A. A.; BOMHOFF, G. L.; SWERDLOW, R. H.; GEIGER, P. C. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **Diabetes**, 2009. <https://doi.org/10.2337/db08-1070>.

GUTHOLD, R.; STEVENS, G. A.; RILEY, L. M.; BULL, F. C. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1.9 million participants. **The Lancet Global Health**, 2018. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30357-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30357-7).

HAFEN, P. S.; PREECE, C. N.; SORENSEN, J. R.; HANCOCK, C. R.; HYLDAHL, R. D. Repeated exposure to heat stress induces mitochondrial adaptation in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 2018. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00383.2018>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.C. Free radicals in biology and medicine, fourth edition. **Free Radical Biology and Medicine**, 2007.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophysics**, 2017a. <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337>.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochemistry and Photobiology**, 2017b. <https://doi.org/10.1111/php.12864>.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. 2006. **Mechanisms for Low-Light Therapy** [...]. [S. l.: s. n.], 2006. <https://doi.org/10.1117/12.646294>.

HANÇER, N. J.; QIU, W.; CHERELLA, C.; LI, Y.; COPPS, K. D.; WHITE, M. F. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, 2014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.554162>.

HASSAN, R. H.; DE SOUSA, A. C. P.; MAHFOUZ, R.; HAINAULT, I.; BLACHNIO-ZABIELSKA, A.; BOURRON, O.; KOSKAS, F.; GÓRSKI, J.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F.; HAJDUCH, E.. Sustained action of ceramide on the insulin signaling pathway in muscle cells: Implication of the double-stranded RNA-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, 2016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.686949>.

HAYWORTH, C. R.; ROJAS, J. C.; PADILLA, E.; HOLMES, G. M.; SHERIDAN, E. C.; GONZALEZ-LIMA, F. In vivo low-level light therapy increases cytochrome oxidase in skeletal muscle. **Photochemistry and Photobiology**, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00732.x>.

HEHNER, S. P.; BREITKREUTZ, R.; SHUBINSKY, G.; UNSOELD, H.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SCHMITZ, M. L.; DRÖGE, W. Enhancement of T Cell Receptor Signaling by a Mild Oxidative Shift in the Intracellular Thiol Pool. **The Journal of Immunology**, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4319>.

HEISKANEN, V.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation: Lasers: vs. light emitting diodes? **Photochemical and Photobiological Sciences**, 2018. <https://doi.org/10.1039/c8pp00176f>.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. 2000. **Free Radical Biology and Medicine** [...]. [S. l.: s. n.], 2000. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00252-5).

HEO, J. C.; PARK, J. A.; KIM, D. K.; LEE, J. H. Photobiomodulation (660 nm) therapy reduces oxidative stress and induces BDNF expression in the hippocampus. **Scientific Reports**, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46490-4>.

HERNÁNDEZ-ALVAREZ, M. I.; THABIT, H.; BURNS, N.; SHAH, S.; BREMA, I.; HATUNIC, M.; FINUCANE, F.; LIESA, M.; CHIELLINI, C.; NAON, D.; ZORZANO, A.; NOLAN, J. J. Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1 α /mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. **Diabetes Care**, 2010. <https://doi.org/10.2337/dc09-1305>.

HERVOUET, E.; CÍZKOVÁ, A.; DEMONT, J.; VOJTÍSKOVÁ, A.; PECINA, P.; HAL, N. L. W. F.; KEIJER, J.; SIMONNET, H.; IVÁNEK, R.; KMOCH, S.; GODINOT, C.; HOUSTEK, J. HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer. **Carcinogenesis**, 2008. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn125>.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GÖRGÜN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. A central, role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, 2002. <https://doi.org/10.1038/nature01137>.

HØJLUND, K.; BIRK, J. B.; KLEIN, D. K.; LEVIN, K.; ROSE, A. J.; HANSEN, B. F.; NIELSEN, J. N.; BECK-NIELSEN, H.; WOJTASZEWSKI, J. F.P. Dysregulation of glycogen synthase COOH- and NH₂-terminal phosphorylation by insulin in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2009. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0897>.

HOLLAND, W. L.; BIKMAN, B. T.; WANG, L. P.; YUGUANG, G.; SARGENT, K. M.; BULCHAND, S.; KNOTTS, T. A.; SHUI, G.; CLEGG, D. J.; WENK, M. R.; PAGLIASSOTTI, M. J.; SCHERER, P. E.; SUMMERS, S. A. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. **J. Clin. Invest.**, 2011. <https://doi.org/10.1172/JCI43378>.

HOLLOWAY, G. P.; THRUSH, A. B.; HEIGENHAUSER, G. J.F.; TANDON, N. N.; DYCK, D. J.; BONEN, A.; SPRIET, L. L. Skeletal muscle mitochondrial FAT/CD36 content and palmitate oxidation are not decreased in obese women. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2007. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00639.2006>.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E. D.; LANDER, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04634>.

HU, W. P.; WANG, J. J.; YU, C. Li; LAN, C. C. E.; CHEN, G. S.; YU, H.. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **Journal of Investigative Dermatology**, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700826>.

HUANG, Y. Y.; NAGATA, K.; TEDFORD, C. E.; MC-CARTHY, T.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **J Biophotonics**, 2013. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200157>.

INDO, H. P.; DAVIDSON, M.; YEN, H. C.; SUENAGA, S.; TOMITA, K.; NISHII, T.; HIGUCHI, M.; KOGA, Y.; OZAWA, T.; MAJIMA, H. J. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. **Mitochondrion**, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.11.026>.

JACOBS, R. A.; DÍAZ, V.; MEINILD, A. K.; GASSMANN, M.; LUNDBY, C. The C57Bl/6 mouse serves as a suitable model of human skeletal muscle mitochondrial function. **Experimental Physiology**, 2013. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.070037>.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic Biol Med**, 1990. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2).

JHU, JOHNS HOPKINS UNIVERSITY & MEDICINE (JHU). COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at **Johns Hopkins University (JHU)**, 2020. Disponível em: < <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> >. (Acesso em 16 Ago 2020).

KAHN, R. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, 1997. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.7.1183>.

KAHN, Steven E.; HULL, Rebecca L.; UTZSCHNEIDER, Kristina M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05482>.

KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. 2012. **Molecular Aspects of Medicine**, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.011>.

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocrine Journal**, 2006. <https://doi.org/10.1507/endocrj.KR-65>.

KARLSSON, H. K. R.; ZIERATH, J. R.; KANE, S.; KROOK, A.; LIENHARD, G. E.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. **Diabetes**, 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1692>.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00219-X).

KARU, T. I. Low-power laser therapy. **Biomedical Photonics: Handbook**. [S. l.: s. n.], 2003.

KARU, T. I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **IUBMB Life**, 2010. <https://doi.org/10.1002/iub.359>.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers in Surgery and Medicine**, 2005. <https://doi.org/10.1002/lsm.20148>.

KELLEY, D. E.; GOODPASTER, B.; WING, R. R.; SIMONEAU, J. A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 1999. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.6.e1130>.

KELLEY, D. E.; HE, J.; MENSHIKOVA, E. V.; RITOV, V. B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, 2002. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.2944>.

KISLINGER, T.; GRAMOLINI, A. O.; PAN, Y.; RAHMAN, K.; MACLENNAN, D. H.; EMILI, A. Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation. **Molecular and Cellular Proteomics**, 2005. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400182-MCP200>.

KROOK, A.; ROTH, R. A.; JIANG, X. J.; ZIERATH, J. R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. **Diabetes**, 1998. <https://doi.org/10.2337/diab.47.8.1281>.

KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.004>.

KYRIAKIS, J. M.; WOODGETT, J. R.; AVRUCH, J. The stress-activated protein kinases. A novel ERK subfamily responsive to cellular stress and inflammatory cytokines. **Ann N Y Acad Sci**, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb26683.x>.

LAMBERTUCCI, R. H.; HIRABARA, S. M.; SILVEIRA, L. R.; LEVADA-PIRES, A. C.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, 2008. <https://doi.org/10.1002/jcp.21463>.

LARSEN, S.; NIELSEN, J.; HANSEN, C. N.; NIELSEN, L. B.; WIBRAND, F.; STRIDE, N.; SCHRODER, H. D.; BOUSHEL, R.; HELGE, J. W.; DELA, F.; HEY-MOGENSEN, M. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **Journal of Physiology**, 2012. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230185>.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).

LIESA, M.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. **Physiological Reviews**, 2009. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>.

LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell Metabolism**, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.002>.

LIMA, A. M. C. T.; SILVA-SERGIO, L. P.; SOUZA-FONSECA, A. Photobiomodulation via multiple-wavelength radiations. **Lasers in Medical Science**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02879-1>.

LIN, H. Y.; WENG, S. W.; CHANG, Y. H.; SU, Y. J.; CHANG, C. M.; TSAI, C. J.; SHEN, F. C.; CHUANG, J. H.; LIN, T. K.; LIOU, C. W.; LIN, C. Y.; WANG, P. W. The causal role of mitochondrial dynamics in regulating insulin resistance in diabetes: Link through mitochondrial reactive oxygen species. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7514383>.

LITTLEJOHNS, B.; PASDOIS, P.; DUGGAN, S.; BOND, A. R.; HEESOM, K.; JACKSON, C. L.; ANGELINI, G. D.; HALESTRAP, A. P.; SULEIMAN, M. S. Hearts from mice fed a non-obesogenic high-fat diet exhibit changes in their oxidative state, calcium and mitochondria in parallel with increased susceptibility to reperfusion injury. **PLoS ONE**, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100579>.

LIU, C. T.; BROOKS, G. A. Mild heat stress induces mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes. **Journal of Applied Physiology**, 2012. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00989.2011>.

LIU, R.; JIN, P.; YU, L.; WANG, Y.; HAN, L.; SHI, T.; LI, X. Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. **PLoS ONE**, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092810>.

LOWELL, B. B.; SHULMAN, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1104343>.

MADUNGWE, N. B.; ZILBERSTEIN, N. F.; FENG, Y.; BOPASSA, J. C. Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart. **Am J Cardiovasc Dis**, 2016.

MARKLUND, S. MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, 1974. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>.

MARTINS, A. R.; NACHBAR, R. T.; GORJAO, R.; VINOLO, M. A.; FESTUCCIA, W. T.; LAMBERTUCCI, R. H.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; SILVEIRA, L. R.; CURI, R.; HIRABARA, S. M. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: Importance of the mitochondrial function. **Lipids in Health and Disease**, 2012. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-30>.

MARTINS, D. F.; TURNES, B. L.; CIDRAL-FILHO, F. J.; BOBINSKI, F.; ROSAS, R. F.; DANIELSKI, L. G.; PETRONILHO, F.; SANTOS, A. R.S. Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. **Neuroscience**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.035>.

MARTINS, L. P. O.; SANTOS, F. F.; COSTA, T. E. D.; LACERDA, A. C. R.; SANTOS, J. M.; COSTA, K. B.; SANTOS, A. P.; GAIAD, T. P.; PINFILD, C. E.; ROCHA-VIEIRA, E.; MENDONÇA, V. A.; OLIVEIRA, M. X. Photobiomodulation therapy (light-emitting diode 630 nm) favored the oxidative stress and the preservation of articular cartilage in na induced

knee osteoarthritis model. **Photobiomodulation, Photomedicine and Laser Surgery**, 2021. <https://doi.org/10.1089/photob.2020.4926>.

MASHA, R. T.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates transcription of genes involved in the electron transport chain. **Photomedicine and Laser Surgery**, 2013. <https://doi.org/10.1089/pho.2012.3369>.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **Journal of Nutrition**, 2003. <https://doi.org/10.1093/jn/133.3.933s>.

MOGENSEN, M.; SAHLIN, K.; FERNSTRÖM, M.; GLINTBORG, D.; VIND, B. F.; BECK-NIELSEN, H.; HØJLUND, K. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, 2007. <https://doi.org/10.2337/db06-0981>.

MONTGOMERY, M. K.; HALLAHAN, N. L.; BROWN, S. H.; LIU, M.; MITCHELL, T. W.; COONEY, G. J.; TURNER, N. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. **Diabetologia**, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2846-8>.

MONTGOMERY, M. K.; TURNER, N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: An update. **Endocrine Connections**, 2015. <https://doi.org/10.1530/EC-14-0092>.

MORINO, K.; PETERSEN, K. F.; DUFOUR, S.; BEFROY, D.; FRATTINI, J.; SHATZKES, N.; NESCHEN, S.; WHITE, M. F.; BILZ, S.; SONO, S.; PYPART, M.; SHULMAN, G. I. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. **Journal of Clinical Investigation**, 2005. <https://doi.org/10.1172/JCI25151>.

MORTON, N. M.; HOLMES, M. C.; FIÉVET, C.; STAELS, B.; TAILLEUX, A.; MULLINS, J. J.; SECKL, J. R. Improved Lipid and Lipoprotein Profile, Hepatic Insulin Sensitivity, and Glucose Tolerance in 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Null Mice. **Journal of Biological Chemistry**, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103676200>.

NABBEN, M.; SHABALINA, I. G.; MOONEN-KORNIPS, E.; VAN BEURDEN, D.; CANNON, B.; SCHRAUWEN, P.; NEDERGAARD, J.; HOEKS, J. Uncoupled respiration, ROS production, acute lipotoxicity and oxidative damage in isolated skeletal muscle mitochondria from UCP3-ablated mice. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.003>.

NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **Journal of Experimental Medicine**, 2011. <https://doi.org/10.1084/jem.20110367>.

NASCIMENTO, J. J. A. C.; MACHADO, A. S. D.; DELLA-SANTA, G. M. L.; FERNANDES, D. C.; FERREIRA, M. C.; MACHADO, G. A. P.; CHAVES, B. C. G.; COSTA, K. B.; ROCHA-VIEIRA, E.; OLIVEIRA, M. X.; GAIAD, T. P.; SANTOS, A. P. Effects of photobiomodulation therapy on functional recovery, angiogenesis and redox status in denervated muscle of rats. **Einstein (São Paulo)**, 2021. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021AO6001.

NGUYEN, L. M.D.; MALAMO, A. G.; LARKIN-KAISER, K. A.; BORSA, P. A.; ADHIHETTY, P. J. Effect of near-infrared light exposure on mitochondrial signaling in C2C12 muscle cells. **Mitochondrion**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.11.001>.

NISOLI, E.; TONELLO, C.; CARDILE, A.; COZZI, V.; BRACALE, R.; TEDESCO, L.; FALCONE, S.; VALERIO, A.; CANTONI, O.; CLEMENTI, E.; MONCADA, S.; CARRUBA, M. O. Cell biology: Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. **Science**, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1117728>.

NUNNARI, J.; WONG, E. D.; MEEUSEN, S.; WAGNER, J. A. Studying the behavior of mitochondria. **Methods in Enzymology**, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)51859-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)51859-0).

NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) of 810 nm upon in Vitro Growth of Bacteria: Relevance of Irradiance and Radiant Exposure. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, 2003. <https://doi.org/10.1089/104454703322564497>.

OGIHARA, T.; ASANO, T.; KATAGIRI, H.; SAKODA, H.; ANAI, M.; SHOJIMA, N.; ONO, H.; FUJISHIRO, M.; KUSHIYAMA, A.; FUKUSHIMA, Y.; KIKUCHI, M.; NOGUCHI, N.; ABURATANI, H.; GOTOH, Y.; KOMURO, I.; FUJITA, T. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor- κ B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. **Diabetologia**, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1391-x>.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 1979. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

OLUSI, S. O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **Int J Obes Relat Metab Disord** 2002. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802066>.

ØRTENBLAD, N.; MOGENSEN, M.; PETERSEN, I.; HØJLUND, K.; LEVIN, K.; SAHLIN, K.; BECK-NIELSEN, H.; GASTER, M. Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: Evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.04.001>.

PALMER, C. S.; OSELLAME, L. D.; STOJANOVSKI, D.; RYAN, M. T. The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery. **Cellular Signalling**, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.021>.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: Molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, 2000. <https://doi.org/10.1172/JCI10582>.

PETERSEN, K. F.; DUFOUR, S.; BEFROY, D.; GARCIA, R.; SHULMAN, G. I. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, 2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031314>.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. **Physiological Reviews**, 2018. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>.

PILON, G.; CHARBONNEAU, A.; WHITE, P. J.; DALLAIRE, P.; PERREAULT, M.; KAPUR, S.; MARETTE, A. Endotoxin mediated-INO^S induction causes insulin resistance via ONOO⁻ induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. **PLoS ONE**, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015912>.

PÖNTINEN, P. J.; AALTOKALLIO, T.; KOLARI, P. J.; AIRAKSINEN, O. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl diode laser, a specific type of noncoherent led) on skin blood flow of the read. **Acupuncture and Electro-Therapeutics Research**, 1996. .

POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S.; ARNDT, K. A.; SILAPUNT, S.; ALAM, M.. Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and efficacy. **Dermatologic Surgery**, 2005. <https://doi.org/10.1097/00042728-200503000-00016>.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological Reviews**, 2008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>.

POWERS, S. K.; LENNON, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle. 1999. **Proceedings of the Nutrition Society** [...]. [*S. l.: s. n.*], 1999. <https://doi.org/10.1017/S0029665199001342>.

PREVIS, S. F.; WITHERS, D. J.; REN, J. M.; WHITE, M. F.; SHULMAN, G. I. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006490200>.

PUTTI, R.; MIGLIACCIO, V.; SICA, R.; LIONETTI, L. Skeletal muscle mitochondrial bioenergetics and morphology in high fat diet induced obesity and insulin resistance: Focus on dietary fat source. **Frontiers in Physiology**, 2016. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00426>.

QUIRÓS, P. M.; RAMSAY, A. J.; SALA, D.; FERNÁNDEZ-VIZARRA, E.; RODRÍGUEZ, F.; PEINADO, J. R.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. S.; VEGA, J. A.; ENRÍQUEZ, J. A.; ZORZANO, A.; LÓPEZ-OTÍN, C. Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. **EMBO Journal**, 2012. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.70>.

RANI, V.; DEEP, G.; SINGH, R. K.; PALLE, K.; YADAV, U. C.S. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>.

RECTOR, R. S.; THYFAULT, J. P.; UPTERGROVE, G. M.; MORRIS, E. M.; NAPLES, S. P.; BORENGASSER, S. J.; MIKUS, C. R.; LAYE, M. J.; LAUGHLIN, M. H.; BOOTH, F.

W.; IBDAH, J. A. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. **Journal of Hepatology**, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.11.030>.

REIS, F. Contenção e manipulação de animais de laboratório. **Health & Medicine**. Mar 2016. Disponível em: < <http://www.slideshare.net/fernandareisdossantos3/1-conteno-e-manipulao-de-animais-de-laboratrio> >.

RENDINA-RUEDY, E.; SMITH, B. J. Methodological considerations when studying the skeletal response to glucose intolerance using the diet-induced obesity model. **BoneKEY Reports**, 2016. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.71>.

RICO-CAMPÀ, A.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A.; ALVAREZ-ALVAREZ, I.; DE DEUS MENDONÇA, R.; DE LA FUENTE-ARRILLAGA, C.; GÓMEZ-DONOSO, C.; BES-RASTROLLO, M. Association between consumption of ultra-processed foods and all cause mortality: SUN prospective cohort study. **The BMJ**, 2019. <https://doi.org/10.1136/bmj.11949>.

RITOV, V. B.; MENSHIKOVA, E. V.; HE, J.; FERRELL, R. E.; GOODPASTER, B. H.; KELLEY, D. E. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.8>.

SABINO, C. P.; DEANA, A. M.; YOSHIMURA, T. M.; SILVA, D. F.T.; FRANÇA, C. M.; HAMBLIN, M. R.; RIBEIRO, M. S. The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.047>.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, 2001. <https://doi.org/10.1038/414799a>.

SALEHPOUR, F.; FARAJDOKHT, F.; CASSANO, P.; SADIGH-ETEGHAD, S.; ERFANI, M.; HAMBLIN, M. R.; SALIMI, M. M.; KARIMI, P.; RASTA, S. H.; MAHMOUDI, J. Near-infrared photobiomodulation combined with coenzyme Q₁₀ for depression in a mouse model of restraint stress: reduction in oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis. **Brain Res. Bull.**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.010>.

SAMJOO, I. A.; SAFDAR, A.; HAMADEH, M. J.; RAHA, S.; TARNOPOLSKY, M. A. The effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. **Nutr Diabetes**, 2013. <https://doi.org/10.1038/nutd.2013.30>.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. **Journal of Clinical Investigation**, 2016. <https://doi.org/10.1172/JCI77812>.

SANTOS, T. C.; BRITO-SOUSA, K.; ANDREO, L.; MARTINELLI, A.; RODRIGUES, M. F. S. D.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S.; MESQUITA-FERRARI, R. A. Effect of Photobiomodulation on C2C12 Myoblasts Cultivated in M1 Macrophage-conditioned Media. **Photochemistry and Photobiology**, 2020. <https://doi.org/10.1111/php.13215>.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: Modulation by nutrients and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI34260>.

SCHMID, G. M.; CONVERSET, V.; WALTER, N.; SENNITE, M. V.; LEUNG, K. Y.; BYERS, H.; WARD, M.; HOCHSTRASSER, D. F.; CAWTHORNE, M. A.; SANCHEZ, J. C. Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice. 2004. **Proteomics** [...]. [S. l.: s. n.], 2004. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300810>.

SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B.; KOOI, M. E.; HESSELINK, M. K.C.; JENESON, J. A.L.; BACKES, W. H.; VAN ECHELD, C. J.A.; VAN ENGELSHOVEN, J. M.A.; MENSINK, M.; SCHRAUWEN, P. Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. **Diabetologia**, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0475-1>.

SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M. K.C. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. **Diabetes**, 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.6.1412>.

SCHULZ, H. Beta oxidation of fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, 1991. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90015-A](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90015-A).

SENN, J. J. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. **J Biol Chem**, 2006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513304200>.

SERGI, D.; NAUMOVSKI, N.; HEILBRONN, L. K.; ABEYWARDENA, M.; O'CALLAGHAN, N.; LIONETTI, L.; LUSCOMBE-MARSH, N. Mitochondrial (dys)function and insulin resistance: From pathophysiological molecular mechanisms to the impact of diet. **Frontiers in Physiology**, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00532>.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. 2000. **Drug Metabolism Reviews**, 2000. <https://doi.org/10.1081/DMR-100102336>.

SHAO, J.; YAMASHITA, H.; QIAO, L.; FRIEDMAN, J. E. Decreased Akt kinase activity and insulin resistance C57BL/KsJ-Lepr(db/db) mice. **Journal of Endocrinology**, 2000. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1670107>.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, 2006. <https://doi.org/10.1172/JCI28898>.

SHIM, K.; BEGUM, R.; YANG, C.; WANG, H. Complement activation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, 2020. <https://doi.org/10.4239/wjd.v11.i1.1>.

SHORT, K. R.; BIGELOW, M. L.; KAHL, J.; SINGH, R.; COENEN-SCHIMKE, J.; RAGHAVAKAIMAL, S.; NAIR, K. S. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501559102>.

SIES, H.; JONES, D. Oxidative Stress. **Encyclopedia of Stress**, 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00285-3>.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. 1995. **American Journal of Clinical Nutrition**, 1995. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1315s>.

SILVA, G.; FERRARESI, C.; ALMEIDA, R. T.; MOTTA, M. L.; PAIXÃO, T.; OTTONE, V. O.; FONSECA, I. A.; OLIVEIRA, M. X.; ROCHA-VIEIRA, E.; DIAS-PEIXOTO, M. F.; ESTEVES, E. A.; COIMBRA, C. C.; AMORIM, F. T.; MAGALHÃES, F. C. Insulin resistance is improved in high-fat fed mice by photobiomodulation therapy at 630 nm. **Journal of Biophotonics**, 2020. <https://doi.org/10.1002/jbio.201960140>.

SILVA, G.; FERRARESI, C.; ALMEIDA, R. T.; MOTTA, M. L.; PAIXÃO, T.; OTTONE, V. O.; FONSECA, I. A.; OLIVEIRA, M. X.; ROCHA-VIEIRA, E.; DIAS-PEIXOTO, M. F.; ESTEVES, E. A.; COIMBRA, C. C.; AMORIM, F. T.; MAGALHÃES, F. C. Infrared photobiomodulation (PBM) therapy improves glucose metabolism and intracellular insulin pathway in adipose tissue of high-fat fed mice. **Lasers in Medical Science**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2408-2>.

SILVEIRA, P. C. L.; FERREIRA, G. K.; ZACCARON, R. P.; GLASER, V.; REMOR, A. P.; MENDES, C.; PINHO, R. A.; LATINI, A. Effects of photobiomodulation on mitochondria of brain, muscle, and C6 astrogloma cells. **Medical Engineering and Physics**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2019.05.008>.

SOMMER, A. P.; SCHEMMER, P.; PAVLÁTH, A. E.; FÖRSTERLING, H. D.; MESTER, A. R.; TRELLES, M. A. Quantum biology in low level light therapy: death of a dogma. **Ann Transl Med**, 2020. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.03.159>.

SPARKS, L. M.; XIE, H.; KOZA, R. A.; MYNATT, R.; HULVER, M. W.; BRAY, G. A.; SMITH, S. R. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. **Diabetes**, 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.7.1926>.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. 2005. **Lancet** [...]. [S. l.: s. n.], 2005. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X).

SUN, X. J.; ROTHENBERG, P.; KAHN, C. R.; BACKER, J. M.; ARAKI, E.; WILDEN, P. A.; CAHILL, D. A.; GOLDSTEIN, B. J.; WHITE, M. F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, 1991. <https://doi.org/10.1038/352073a0>.

SZENDROEDI, J.; YOSHIMURA, T.; PHIELIX, E.; KOLIAKI, C.; MARCUCCI, M.; ZHANG, D.; JELENIK, T.; MÜLLER, J.; HERDER, C.; NOWOTNY, P. et al. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409229111>.

TAGER, H.; GIVEN, B.; BALDWIN, D.; MAKO, M.; MARKESE, J.; RUBENSTEIN, A.; OLEFSKY, J.; KOBAYASHI, M.; KOLTERMAN, O.; POUCHER, R. A structurally abnormal insulin causing human diabetes. **Nature**, 1979. <https://doi.org/10.1038/281122a0>.

TAO, C.; HOLLAND, W. L.; WANG, Q. A.; SHAO, M.; JIA, L.; SUN, K.; LIN, X.; KUO, Y. C.; JOHNSON, J. A.; GORDILLO, R.; ELMQUIST, J. K.; SCHERER, P. E. Short-term versus long-term effects of adipocyte toll-like receptor 4 activation on insulin resistance in male mice. **Endocrinology**, 2017. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00024>.

TARTOF, S. Y.; QIAN, L.; HONG, V.; WEI, R.; NADJAFI, R. F.; FISCHER, H.; LI, Z.; SHAW, S. F.; CAPAROSA, S. L.; NAU, C. L.; SAXENA, T.; RIEG, G. K.; ACKERSON, B. K.; SHARP, A. L.; SKARBINSKI, J.; NAIK, T. K.; MURALI, S. B. Obesity and Mortality Among Patients Diagnosed With COVID-19: Results From an Integrated Health Care Organization. **Annals of Internal Medicine**, 2020. <https://doi.org/10.7326/M20-3742>.

TATMATSU-ROCHA, J. C.; FERRARESI, C.; HAMBLIN, M. R.; DAMASCENO-MAIA, F.; NASCIMENTO, N. R. F.; DRIUSSO, P.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (904 nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.017>.

TIAN, Y. F.; HSIA, T. L.; HSIEH, C. H.; HUANG, D.W.; CHEN, C.H.; HSIEH, P. S. The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. **Life Sci**, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.006>

TOLEDO, F. G.S.; MENSHIKOVA, E. V.; RITOV, V. B.; AZUMA, K.; RADIKOVA, Z.; DELANY, J.; KELLEY, D. E. Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes. **Diabetes**, 2007. <https://doi.org/10.2337/db07-0141>.

TONKS, K. T.; NG, Y.; MILLER, S.; COSTER, A. C.F.; SAMOCHA-BONET, D.; ISELI, T. J.; XU, A.; PATRICK, E.; YANG, J. Y.H.; JUNUTULA, J. R.; MODRUSAN, Z.; KOLUMAM, G.; STÖCKLI, J.; CHISHOLM, D. J.; JAMES, D. E.; GREENFIELD, J. R. Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects. **Diabetologia**, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2811-y>.

TORKANLOU, K.; BIBAK, B.; ABBASPOUR, A.; ABDI, H.; MOGHADDAM M. S.; TAYEFI, M.; MOHAMMADZADEH, E.; BANA, H. S.; AGHASIZADE, M.; FERNS, G. A.; AVAN, A.; MOBARHAN, M. G. Reduced serum levels of zinc and superoxide dismutase in obese individuals. **Ann Nutr Metab**, 2016. <https://doi.org/10.1159/000454894>.

TREMBLAY, F.; LAVIGNE, C.; JACQUES, H.; MARETTE, A. Defective Insulin-Induced GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle of High Fat-Fed Rats Is Associated with Alterations in Both Akt/Protein Kinase B and Atypical Protein Kinase C (ζ/λ) Activities. **Diabetes**, 2001. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1901>.

TUNCMAN, G.; HIROSUMI, J.; SOLINAS, G.; CHANG, L.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in

obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603509103>.

VENTURA-CLAPIER, R.; GARNIER, A.; VEKSLER, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: The central role of PGC-1 α . **Cardiovascular Research**, 2008. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn098>.

VESELY, P. W.; STABER, P. B.; HOEFLER, G.; KENNER, L. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. **Mutation Research**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.01.001>

VIEIRA, W. H. B.; FERRARESI, C.; SCHWANTES, M. L. B.; ANDRADE-PEREZ, S. E.; BALDISSERA, V.; CERQUEIRA, M. S.; PARIZOTTO, N. A. Photobiomodulation increases mitochondrial citrate synthase activity in rats submitted to aerobic training. **Lasers in Medical Science**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2424-2>.

VIJAYVARGIA, R.; MANN, K.; WEISS, H. R.; POWNALL, H. J.; RUAN, H. JNK deficiency enhances fatty acid utilization and diverts glucose from oxidation to glycogen storage in cultured myotubes. **Obesity (Silver Spring)**, 2010. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.501>.

WANG, H.; DENG, J.; TU, W.; ZHANG, L.; CHEN, H.; WU, X.; LI, Y.; SHA, H. The hematologic effects of low intensity 650 nm laser irradiation on hypercholesterolemia rabbits. **American Journal of Translational Research**, 2016.

WANG, Y.; QIAN, Y.; FANG, Q.; ZHONG, P.; LI, W.; WANG, L.; FU, W.; ZHANG, Y.; XU, Z.; LI, X.; LIANG, G. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. **Nat. Commun.**, 2017.

WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. **Experimental Cell Research**, 2001. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5375>.

WAYNER, D. D.M.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.; BARCLAY, L. R.C.; LOCKE, S. J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. **BBA - General Subjects**, 1987. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(87\)90155-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(87)90155-3).

WESTERMANN, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. 2012. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics** [...]. [S. l.: s. n.], 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.033>.

WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>.

WHELAN, H. T.; SMITS, R. L.; BUCHMAN, E. V.; WHELAN, N. T.; TURNER, S. G.; MARGOLIS, D. A.; CEVENINI, V.; STINSON, H.; IGNATIUS, R.; MARTIN, T.; CWIKLINSKI, J.; PHILIPPI, A. F.; GRAF, W. R.; HODGSON, B.; GOULD, L.; KANE, M.; CHEN, G.; CAVINESS, J. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound

healing. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, 2001. <https://doi.org/10.1089/104454701753342758>.

WHITE, M. F. The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 1998. <https://doi.org/10.1023/A:1006806722619>.

WHITE, P. A.S.; CERCATO, L. M.; ARAÚJO, J. M.D.; SOUZA, L. A.; SOARES, A. F.; BARBOSA, A. P. O.; NETO, J. M. R.; MARÇAL, A. C.; MACHADO, U. F.; CAMARGO, E. A.; SANTOS, M. R.V.; BRITO, L. C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000500002>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes. **World Health Organization (WHO)**, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>. (Acesso em 19 Set 2022).

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity. **World Health Organization (WHO)**, 2021b. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity#:~:text=In%202016%2C%20more%20than%201.9,of%20being%20overweight%20or%20obese>>. (Acesso em 19 Set 2022).

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. **World Health Organization (WHO)**, 2021a. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. (Acesso em 19 Set 2022).

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Top 10 causes of death. **World Health Organization (WHO)**, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. (Acesso em 19 Set 2022).

WIJESSEKARA, N.; KONRAD, D.; EWEIDA, M.; JEFFERIES, C.; LIADIS, N.; GIACCA, A.; CRACKOWER, M.; SUZUKI, A.; MAK, T. W.; KAHN, C. R.; KLIP, A.; WOO, M. Muscle-Specific Pten Deletion Protects against Insulin Resistance and Diabetes. **Molecular and Cellular Biology**, 2005. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.3.1135-1145.2005>.

WILDE, J.; MOHREN, R.; VAN-DEN-BERG, S.; BOEKSCHOTEN, M.; DIJK, K. W. V.; GROOT, P.; MÜLLER, M.; MARIMAN, E.; SMIT, E. Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. **Physiological Genomics**, 2008. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00219.2007>.

WILSON-FRITCH, L.; NICOLORO, S.; CHOUINARD, My; LAZAR, M. A.; CHUI, P. C.; LESZYK, J.; STRAUBHAAR, J.; CZECH, M. P.; CORVERA, S. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. **Journal of Clinical Investigation**, 2004. <https://doi.org/10.1172/JCI21752>.

WYCKELSMA, V. L.; LEVINGER, I.; MCKENNA, M. J.; FORMOSA, L. E.; RYAN, M. T.; PETERSEN, A. C.; ANDERSON, M. J.; MURPHY, R. M. Preservation of skeletal muscle mitochondrial content in older adults: relationship between mitochondria, fibre type

and high-intensity exercise training. **Journal of Physiology**, 2017. <https://doi.org/10.1113/JP273950>.

YANG, M.; WEI, D.; MO, C.; ZHANG, J.; WANG, X.; HAN, X.; WANG, Z.; XIAO, H. Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit myokine genes in C2C12 myotubes. **Lipids in Health and Disease**, 2013. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-104>.

YOSHIMURA, T. M.; SABINO, C. P.; RIBEIRO, M. S. Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice. **Journal of Biophotonics**, 2016. <https://doi.org/10.1002/jbio.201600088>.

YOUNGREN, J. F. Regulation of insulin receptor function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6359-9>.

YU, T.; ROBOTHAM, J. L.; YOON, Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511154103>.

YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J.; HANSEN, L.; LI, Z. W.; KARIN, M.; SHOELSON, S. E. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. **Science**, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1061620>.

YUZEFOVYCH, L. V.; MUSIYENKO, S. I.; WILSON, G. L.; RACHEK, L. I. Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction, and Oxidative Stress Are Associated with Endoplasmic Reticulum Stress, Protein Degradation and Apoptosis in High Fat Diet-Induced Insulin Resistance Mice. **PLoS ONE**, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054059>.

ZEIN, R.; SELTING, W.; HAMBLIN, M. R. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. **Journal of Biomedical Optics**, 2018. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.23.12.120901>.



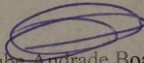
ZHAI, L.; BALLINGER, S. W.; MESSINA, J. L. Role of reactive oxygen species in injury-induced insulin resistance. **Molecular Endocrinology**, 2011. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0224>.

ZIERATH, J. R.; KROOK, A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 1998. <https://doi.org/10.1023/A:1006861628496>.

ZORZANO, A.; HERNÁNDEZ-ALVAREZ, M. I.; PALACÍN, M.; MINGRONE, G. Alterations in the mitochondrial regulatory pathways constituted by the nuclear co-factors PGC-1 α or PGC-1 β and mitofusin 2 in skeletal muscle in type 2 diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbambio.2010.02.017>.

ZORZANO, A.; LIESA, M.; PALACIN, M. Mitochondrial dynamics as a bridge between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. **Archives of Physiology and Biochemistry**, 2009. <https://doi.org/10.1080/13813450802676335>.

ANEXO A - DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFVJM

	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>	
<p>Diamantina, 17 de Setembro de 2015.</p>		
<p>A proposta referente ao</p>		
<p>Protocolo nº:</p> <p>Intitulado:</p> <p>Pesquisador (a) responsável:</p> <p>Universidade/Faculdade/Departamento</p>	<p>028/2014</p> <p><i>“Efeito da terapia crônica com diodo emissor de luz (LED) sobre a resistência à insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta.”</i></p> <p>Prof. Flávio de Castro Magalhães</p> <p>UFVJM / FCBS/ Departamento de Educação Física</p>	
<p>Foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFVJM em 17 de Setembro de 2014.</p> <p><i>Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.</i></p> <p><i>Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.</i></p>		
<p> Cláudio Andrade Boari Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM</p>		
<p>Campus JK Comissão de Ética no Uso de Animais/ UFVJM Prédio da Reitoria-PRPPG- Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000nAlto da Jacuba - Diamantina/MG - CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200</p>		<p>CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais</p>