



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDREA GOMES BERNARDES

**EFEITOS DA FOTOTERAPIA NA HEMODINÂMICA
MICROVASCULAR E OXIGENAÇÃO TECIDUAL DURANTE
REPOUSO E OCLUSÃO VASCULAR EM HOMENS
ADULTOS JOVENS**

Londrina
2019

ANDREA GOMES BERNARDES

**EFEITOS DA FOTOTERAPIA NA HEMODINÂMICA
MICROVASCULAR E OXIGENAÇÃO TECIDUAL DURANTE
REPOUSO E OCLUSÃO VASCULAR EM HOMENS
ADULTOS JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física UEM/UEL, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientadora: Profa. Dra. Solange de P. Ramos.

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bernardes, Andrea Gomes.

Efeitos da fototerapia na hemodinâmica microvascular e oxigenação tecidual durante repouso e oclusão vascular em homens adultos jovens / Andrea Gomes Bernardes. - Londrina, 2019.
51 f.

Orientador: Solange de Paula Ramos.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Educação Física e Esportes, Programa de Pós-Graduação em Educação Física, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Fotobiomodulação - Tese. 2. LED - Tese. 3. Hiperemia reativa - Tese. 4. NIRS - Tese.
I. Ramos, Solange de Paula. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Educação Física e Esportes. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. III. Título.

ANDREA GOMES BERNARDES

**EFEITOS DA FOTOTERAPIA NA HEMODINÂMICA
MICROVASCULAR E OXIGENAÇÃO TECIDUAL DURANTE
REPOUSO E OCLUSÃO VASCULAR EM HOMENS ADULTOS
JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física UEM/UEL, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Educação Física.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Solange de P. Ramos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Leandro Ricardo Altimari
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Andreo Fernando Aguiar
Universidade Norte do Paraná - Unopar

Londrina, 18 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho ao meu marido,
por me fazer acreditar que sou capaz.
Gratidão pela nossa caminhada juntos.

** Amor Vincit Omnia **

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a minha orientadora, Prof.a Dr.a Solange de Paula Ramos, por ter acreditado no potencial desse trabalho de pesquisa e por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou durante o mestrado. Muito grata por me corrigir quando necessário sem nunca me desmotivar e pela amizade que construímos nesses anos.

Ao professor Cosme Franklim Buzzachera, muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições. Agradeço, ainda, por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo.

Ao colega de trabalho e amigo, Juliano Moro Gabardo, com quem partilhei horas e horas de trabalho em coletas de dados, além de conhecimentos preciosos para a minha vida profissional. Aos colegas do grupo de pesquisa GERART e CGR pela parceria, auxílio e pelos cafés.

E finalmente, agradeço a minha família, meu porto seguro e maior exemplo de amor. AMO-VOS e morro de saudades.

Eterna gratidão a todos vocês.

BERNARDES, Andrea Gomes. **Efeitos da fototerapia na hemodinâmica microvascular e oxigenação tecidual durante repouso e oclusão vascular em homens adultos jovens**. 2019. 51f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A fototerapia tem despertado o interesse da comunidade acadêmica e clínica, devido aos seus efeitos de importância biológica no âmbito da saúde e do esporte. Especula-se, atualmente, que os efeitos biológicos da fototerapia são dependentes do estímulo de fotorreceptores presentes nas células irradiadas, denominados cromóforos, capazes de absorver luz nos seus diferentes espectros. Dentre os cromóforos mais debatidos na literatura vigente está a citocromo c oxidase (COX), enzima capaz de dissociar-se da molécula óxido nítrico (NO) quando irradiada, promovendo o aumento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial. O NO dissociado, por sua vez, afeta numerosos processos fisiológicos de importância biológica nos seres vivos, com destaque para seus efeitos na tonicidade vascular. A relação entre fototerapia, NO, e vasotonicidade, contudo, tem sido estudada através de experimentos científicos com modelos animais, e em casos raros, com seres humanos, focando-se, basicamente, na macrocirculação, negligenciando o papel crucial da microcirculação no âmbito da saúde e desempenho humano. Com o surgimento de ferramentas capazes de determinar a hemodinâmica microvascular e a oxigenação tecidual na musculatura esquelética humana, como a espectroscopia por infravermelho próximo (NIRS), novas fronteiras foram abertas no estudo da microcirculação *in vivo*. Usando a tecnologia NIRS associada com a oclusão vascular, o presente documento investigou os efeitos da fototerapia nos parâmetros hemodinâmicos microvasculares e oxigenação tecidual na musculatura esquelética humana. Especificamente, efeitos da aplicação aguda da fototerapia por LED, usando diferentes comprimentos de onda e energia irradiada, na função microvascular foram analisados. Doze adultos, sexo masculino, foram convidados a participar do estudo, o qual foi composto por sete sessões experimentais. Em cada sessão, após aplicação de fototerapia por LED de luz vermelha (630 nm) e infravermelha (940 nm) de diferentes densidades energéticas (4 J.CM⁻², 9 J.CM⁻², e 18 J.CM⁻²) ou sham, teste de oclusão vascular foi realizado, e incluiu 3 min repouso, 5 min vasocclusão, e 5 min reperfusão. Mudanças nas concentrações relativas de hemoglobina (HB) e mioglobina (MB), total (TOTAL-[HB+MB]), oxigenada (OXY-[HB+MB]), e desoxigenada (DEOXY-[HB+MB]), foram obtidas via NIRS, e usadas para a determinação de saturação tecidual de O₂ (S_{TO2}) e, de modo indireto, da responsividade microvascular, um parâmetro reconhecidamente associado com a saúde vascular. Em suma, os achados deste estudo demonstraram que a responsividade microvascular não foi modulada pela fototerapia, independente do comprimento de onda e dose irradiada. Neste contexto, baseado nos resultados expostos na presente pesquisa, pode-se concluir que a fototerapia é uma estratégia potencialmente ineficaz na modulação da função microvascular e otimização da saúde vascular em seres humanos.

Palavras-chave: Fotobiomodulação. LED. Hiperemia reativa. NIRS.

BERNARDES, Andrea Gomes. **Effects of phototherapy on microvascular hemodynamics and tissue oxygenation during rest and vascular occlusion in young adult men**. 2019. 51p. Dissertation (Master's degree in Physical Education) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Photobiomodulation therapy (PBMT) is the low power (1-500 mW) non-thermal delivery of photons in the visible or near infrared spectrum (405-1000 nm) that elicits biological responses in human cells and tissues. Within the last decades, PBMT has been proven to be effective in a large variety of clinical indications. Strikingly, to date, mechanisms underlying the association between PBMT and favorable therapeutic outcomes remain unclear but may include photon absorption by chromophores, including cytochrome c oxidase (COX). Photon absorption leads to dissociation of the inhibitory nitric oxide (NO) from COX leading to increased enzyme activity and raised adenosine triphosphate (ATP) inside the mitochondria. Upon release, NO diffuses through the cell membrane and may elicit a number of physiological processes including calcium and glucose homeostasis, mitochondrial respiration and muscular contractility, and vasodilation. Previous studies in animals have established that both visible or near infrared light irradiation stimulated microcirculation through mechanisms of enhancement of endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation, in which NO may play a key role. Some scarce studies have suggested that these photovasorelaxation effects are replicated in humans; however an inherent limitation of these earlier studies is that the upstream large conduit vessels rather than downstream capillaries within the microcirculation were assessed. Near infrared spectroscopy (NIRS) technology has recently emerged as a non-invasive method for measuring microvascular hemodynamics and tissue oxygenation within the skeletal muscle in humans. Using this easy-to-use and robust method, combined with vascular occlusion, *in vivo* measures of tissue oxygen saturation (S_{T02}) are achievable. The purpose of this dissertation was therefore to elucidate the acute effects of the PBMT on microvascular hemodynamics and skeletal muscle oxygenation rates at both rest and during vascular occlusion in humans. It was examined whether differences in light wavelength and power would affect NIRS-derived measures of microvascular function *in vivo*. Twelve healthy young men volunteered to participate in the current study. On seven separate occasions, the subjects performed a vascular occlusion test (3 min of baseline, 5 min of occlusion, and 5 min following cuff release), which was preceded by a single irradiation of red (630 nm) or infrared (940 nm) light-emitting diode (LED) at different energy densities (4, 9, and 18 J.cm⁻²) or sham. Concentrations of oxygenated (OXY-[HB +MB]), deoxygenated (DEOXY-[HB +MB]), and total hemoglobin *plus* myoglobin (TOTAL-[HB +MB]) were measured using NIRS placed over the forearm throughout the baseline period and vascular occlusion test and used to measure static and dynamic responses in tissue oxygen (O_2) saturation (S_{T02}), a common proxy of microvascular responsiveness at rest. In summary, the results of the current study demonstrated that vascular reactivity within the human microcirculation was unaltered by light irradiation in healthy young men. These findings suggest that PBMT might not represent a practical intervention to stimulate photovasorelaxation effects and to improve vascular health in humans.

Keywords: Photobiomodulation. LED. Reactive hyperaemia. NIRS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
ST _{O₂} AUC	Área sob a curva de ST _{O₂}
COX	Citocromo c oxidase
CNS	Conselho Nacional da Saúde
LED	Diodo emissor de luz
NIRS	Espectroscopia por infravermelho próximo
PBM	Fotobiomodulação
HB	Hemoglobina
DEOXY[HB+MB]	[Hemoglobina + mioglobina] desoxigenada
OXY[HB+MB]	[Hemoglobina + mioglobina] oxigenada
TOTAL[HB+MB]	[Hemoglobina + mioglobina] total
IMC	Índice de massa corporal
MB	Mioglobina
WHO	Organização Mundial da Saúde
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
PAR-Q	Questionário de prontidão para atividade física
IPAQ	Questionário internacional de atividade física
ST _{O₂}	Saturação tecidual de O ₂
ST _{O₂} MAX	Saturação tecidual de O ₂ máxima
ST _{O₂} MIN	Saturação tecidual de O ₂ mínima
ST _{O₂} SLOPE 1	Taxa de desaturação tecidual de O ₂
ST _{O₂} SLOPE 2	Taxa de reperfusão tecidual de O ₂
PBMT	Terapia por fotobiomodulação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	HIPÓTESES	15
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	16
4.1	PARTICIPANTES	16
4.2	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS E INSTRUMENTAIS	17
4.2.1	Delineamento Experimental.....	17
4.2.2	Sessão de Familiarização.....	18
4.2.3	Sessões Experimentais	19
4.2.3.1	<i>Fototerapia</i>	19
4.2.3.2	<i>Teste de Oclusão Vascular</i>	21
4.2.3.3	<i>Espectroscopia por Infravermelho Próximo (NIRS)</i>	21
4.3	TRATAMENTO DOS DADOS E ESTATÍSTICA	23
5	RESULTADOS	25
5.1	MANUSCRITO 1 - Does photobiomodulation by LED improve microvascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy in humans?	28
5.1.1	Abstract	28
5.1.2	Introduction.....	29
5.1.3	Material and Methods	31
5.1.3.1	Ethical Approval.....	31
5.1.3.2	Subjects.....	31
5.1.3.3	Experimental design	32
5.1.3.4	Photobiomodulation (PMBT).....	32
5.1.3.5	Vascular Occlusion Test.....	34

5.1.3.6	Near-infrared spectroscopy	34
5.1.3.7	Statistical analysis	35
5.1.4	Results.....	36
5.1.4.1	PBM with 630 NM red LED	36
5.1.4.2	PBM with 940 NM infrared LED	37
5.1.5	Discussion	37
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A terapia com luz de baixa intensidade, ou fototerapia, compreende a irradiação de tecidos vivos com fontes de luz de baixa intensidade, em comprimentos de onda do vermelho ao infravermelho próximo (625 nm até 1000 nm). Basicamente, a terapia com luz de baixa intensidade compreende o uso de diodos de laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) ou diodos emissores de luz (*light-emitting diode*). Os efeitos biológicos produzidos pela fototerapia sobre tecidos vivos, em seu conjunto, denominam-se fotobiomodulação, e compreendem fenômenos anti-inflamatórios, anti-álgicos, contribuindo ainda para a regeneração e a cicatrização tecidual (LIEBERT et al., 2017). A fototerapia, por conseguinte, tem sido rotineiramente usada como uma estratégia preventiva e terapêutica no âmbito da promoção e recuperação da saúde (KARU, 2013). Cabe destacar que a fototerapia tem sido ultimamente usada, inclusive, como um agente ergogênicos na capacidade para realizar exercício físico em modelos animais e seres humanos, presumivelmente, por efeitos na contratilidade muscular – e sua tolerância ao esforço – e na hemodinâmica microvascular (ANTONIALLI et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2011a; NAMPO et al., 2016).

Historicamente, especulou-se que a origem dos processos fisiológicos associados a fototerapia estava relacionada à estimulação de fotorreceptores presentes nas células irradiadas, capazes de absorver luz em diferentes espectros. A absorção da luz ocorre de modo seletivo e dependente do comprimento da onda irradiada, por compostos fotossensíveis denominados cromóforos, os quais incluem, dentre outros, mioglobina (MB), hemoglobina (HB), melanina, água, além da citocromo c oxidase (COX) (KARU; KOLYAKOV, 2005). O cromóforo mais debatido por pesquisadores da área, COX, pode ser descrito como um fotorreceptor primário para fontes luminosas com comprimentos de onda entre vermelho e infravermelho próximo (KARU, 2010). Quando irradiada, a enzima COX dissocia-se da molécula gasosa óxido nítrico (NO), permitindo a passagem

de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial, aumentando, portanto, a síntese de adenosina trifosfato (ATP). O NO liberado, por sua vez, modula numerosos processos fisiológicos de importância biológica nos seres humanos, dentre os quais, homeostase da glicose e cálcio, contratilidade muscular, respiração e biogênese mitocondrial, além da tonicidade vascular (COOPER, 2002). O estímulo da tonicidade vascular induzido pelo NO liberado, por exemplo, resulta no aumento do lúmen vascular, e contribui, por conseguinte, para um maior volume sanguíneo local e disponibilidade de oxigênio (O_2) ao tecido muscular esquelético (DEJAM et al., 2004). Estudos preliminares reforçam que a fototerapia causa, de fato, aumentos notáveis e transitórios nas concentrações plasmáticas de NO em modelos animais e humanos (IPOVSKY et al., 2012; LINDGARD et al., 2006; MITCHELL; MACK, 2013; ZHANG et al., 2009). Cabe notar, contudo, que a produção e biodisponibilidade de NO pode ser estimulada pela fototerapia também por mecanismos independentes à dissociação da enzima COX, incluindo, por exemplo, mudanças na pressão parcial de oxigênio ($P_{A}O_2$) (BALL et al., 2011) e dissociação de formas nitrosiladas de ambas HB e MB (LOHR et al., 2009). Deste modo, pesquisadores da área têm buscado estratégias fototerápicas capazes de potencializar o aumento da produção e biodisponibilidade de NO, por mecanismos dependentes ou independentes da enzima COX.

A literatura atual destaca, contudo, que novas estratégias fototerápicas devem considerar as características “bifásicas” da luz, onde iguais densidades energéticas, originárias da relação entre tempo de exposição e energia irradiada ($MW \cdot cm^{-2}$), geram desfechos biológicos diferentes (LANZAFAME et al., 2007; ORON et al, 2001). De fato, tal hipótese “bifásica” confirma pressupostos criados no Século XIX (SCHULZ, 1888), refutando premissas clássicas e divergentes de repostas “monofásicas” da fototerapia (BRINDLEY, 1952), onde a relação linear e inversa entre tempo de exposição e dose irradiada e efeitos de importância biológica seria evidente (KARU; KOLYAKOV, 2005; LUBART et al., 2006). A existência de uma característica “bifásica” da luz irradiada,

por conseguinte, reforça a necessidade eminente de estudos capazes de determinar como diferentes propriedades físicas da luz promovem efeitos fotobiomoduladores de importância na saúde e otimização da performance humana, incluindo, hemodinâmica microvascular (MAEGAWA et al., 2000) e metabolismo oxidativo (GRECO et al., 1989; KARU, 1999).

Sob uma perspectiva teórica, acredita-se que, até o momento, nenhum estudo tenha conduzido para investigar se a fototerapia pode modular a microcirculação em seres humanos. Estimativas *in vivo* de parâmetros macro- e microvasculares em seres humanos eram obtidas, até recentemente, mediante uso de procedimentos morosos, inseguros e invasivos (THIJSEN et al., 2011); entretanto, com o advento de novas tecnologias ópticas, como espectroscopia por infravermelho próximo (NIRS), o estudo de respostas hemodinâmicas microvasculares e oxigenação tecidual *in vivo* tornou-se enfim facilitada (QUARESIMA; GRASSI, 2016). A tecnologia NIRS permite determinar *in loci* mudanças (Δ) nas concentrações relativas de HB e MB, oxigenada (OXY-[HB+MB]) ou desoxigenada (DEOXY-[HB+MB]), e a concentração total de HB e MB (TOTAL-[HB+MB]) e saturação tecidual de O₂ ($ST_{O_2} = (OXY-[HB+MB]) / (OXY-[HB+MB] + DEOXY-[HB+MB]) \times 100$) (BOPP et al., 2011, 2014; SOUTHERN et al., 2015). Usando o sistema NIRS, a presente dissertação busca corroborar - ou refutar - os escassos estudos conduzidos com modelos animais sugerindo efeitos fotobiomoduladores na microcirculação, os quais variam desde estímulos à vasodilatação até aumentos transitórios na hiperemia local (ANDREWS et al., 2003; CHAUDHRY et al., 1993; MAEGAWA et al., 2000; PLASS et al., 2012).

Cabe notar, ainda, que a presente dissertação examinou, especificamente, os efeitos da fototerapia por LED na ST_{O_2} durante oclusão vascular em adultos jovens, saudáveis. Combinada com oclusão vascular, a tecnologia NIRS determina respostas dinâmicas e magnitude da ST_{O_2} em seres humanos, permitindo aos pesquisadores e

profissionais da área da saúde a determinação de um parâmetro de importância clínica denominado responsividade microvascular (McLAY et al, 2016a, 2016b). Basicamente, a vasoclusão parece estimular a produção e liberação de NO por células endoteliais na microcirculação. Ao final da vasoclusão, um novo estímulo, de caráter transitório, promove uma produção e liberação adicional de NO na microcirculação, causado pelo aumento momentâneo no estresse por esmagamento (*shear stress*) na parede interna do lúmen vascular, decorrente do maior fluxo sanguíneo local. O processo, chamado hiperemia reativa pós-oclusão, tem sido usado para examinar mecanismos fisiológicos regulatórios da responsividade microvascular (TUTTLE et al., 2011). A responsividade microvascular, por sua vez, é usada, atualmente, em estudos com adultos saudáveis (BOPP et al., 2011, 2014; McLAY et al., 2016a, 2016b; ROSENBERRY et al., 2017) e pacientes (DOERSCHUG et al., 2007; HAERTEL et al., 2018; SOARES; MURIAS, 2018), devido a sua associação com função e saúde cardiovascular (ROSENBERRY et al., 2017).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Examinar os efeitos da fototerapia sobre a hemodinâmica microvascular e oxigenação tecidual da musculatura esquelética em homens adultos, saudáveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O1. Examinar os efeitos de diferentes comprimentos de onda e quantidade de energia irradiada da fototerapia na hemodinâmica microvascular e na oxigenação tecidual na musculatura esquelética durante repouso e oclusão vascular em homens adultos, saudáveis.

O2. Examinar os efeitos da fototerapia na responsividade microvascular, parâmetro fisiológico oriundo de respostas da S_{TO_2} durante repouso e vasoclusão em homens adultos, saudáveis.

3 HIPÓTESES

H1. Com base nos pressupostos de Arndt-Schulz (SCHULZ, 1888) e características “bifásicas” da fotobiomodulação comumente reportadas na literatura vigente (HUANG et al, 2009), pode-se especular que as respostas hemodinâmicas microvasculares e oxigenação tecidual da musculatura esquelética serão positivamente moduladas pela fototerapia, de acordo com o comprimento de onda e quantidade de energia irradiada. Neste sentido, acredita-se que efeitos moduladores da fototerapia serão evidenciados, primariamente, após aplicação de um menor comprimento de onda (630 nm) e maior energia irradiada (18 J.cm^{-2}), onde a fotobiomodulação parece ser mais efetiva devido a maior profundidade atingida no tecido de interesse (MANDEL; HAMBLIN, 2012).

H2. Baseado nos achados da literatura vigente referentes aos efeitos biomoduladores da luz na microcirculação de modelos animais e macrocirculação de seres humanos (ANDREWS et al., 2003; CHAUDHRY et al., 1993; MAEGAWA et al., 2000; MATSUO et al., 2000; MITCHELL; MACK, 2013; PLASS et al., 2012) e no aumento transitório da produção e liberação de NO ao organismo humano (IPOVSKY et al., 2012; LINDGARD et al., 2006; MITCHELL; MACK, 2013; ZHANG et al., 2009), pode-se especular que a fototerapia promoverá mudanças positivas na responsividade microvascular, notadas pela modulação de respostas estáticas e dinâmicas da S_{TO_2} durante repouso e oclusão vascular em homens adultos, saudáveis.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 PARTICIPANTES

Baseando-se em uma diferença equivalente a 20% nas respostas cinéticas da responsividade microvascular após oclusão vascular (BOPP et al., 2011; BOPP et al., 2014; McLAY et al., 2016a; ROSENBERRY et al., 2017), um tamanho amostral de seis sujeitos foi determinado (*software* Minitab, versão 14.1, Paris, França), utilizando-se uma magnitude de efeito 0,8 (COHEN, 1988) e nível de significância α 0,05. Para compensar possíveis perdas amostrais por intercorrências técnicas e aumentar a magnitude de efeito da análise, 12 voluntários do sexo masculino entre 18 e 40 anos de idade foram recrutados por conveniência, através de convites verbais feitos pelo pesquisador principal do estudo.

Cada voluntário recebeu esclarecimentos individualizados sobre os propósitos e procedimentos experimentais do estudo, possíveis riscos e benefícios associados à sua participação. Entretanto, para evitar um viés de expectativa, cada participante foi informado que o propósito desta pesquisa foi investigar os efeitos de diferentes doses de fototerapia por irradiação de LED sobre respostas hemodinâmicas microvasculares e oxigenação tecidual da musculatura esquelética no repouso e oclusão vascular. A participação na presente pesquisa foi condicionada a assinatura voluntária do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1). O presente protocolo de pesquisa foi delineado em conformidade com as diretrizes propostas nas resoluções 196/96 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS, 1996; CNS, 1998) para pesquisas em seres humanos. O protocolo de pesquisa desta investigação foi submetido e aprovado pelo comitê de ética institucional da Universidade Pitágoras Unopar, protocolo número 3.061.011.

Os critérios de exclusão usados neste estudo foram: índice de massa corporal (IMC) $<18 \text{ KG.M}^2$ ou $>25 \text{ KG.M}^2$, presença de respostas positivas ao Questionário de Prontidão para Atividade Física (PAR-Q; CARDINAL; CARDINAL, 2000), presença de distúrbios cardiovasculares, respiratórios, osteomusculares, metabólicos, e cognitivos capazes de colocar em risco o participante e/ou afetar o protocolo experimental da pesquisa; uso de medicamentos, agentes anabólicos, e/ou suplemento nutricional que possa influenciar os dados coletados; fumante; condição de insuficientemente ativo, definida como uma prática de exercício físico moderado com duração igual ou inferior a 30 min. em três ou mais dias da semana, avaliada pelo Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ; CARVALHO et al., 1996). Voluntários do sexo masculino foram exclusivamente recrutados nesta pesquisa, devido a diferenças nas respostas vasculares associadas ao sexo (ORSHAL; KHALIL, 2004).

4.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS E INSTRUMENTAIS

4.2.1 Delineamento Experimental

A presente pesquisa foi empregou um delineamento experimental prospectivo, aleatório, duplo-cego, e cruzado com grupo controle (THOMAS; NELSON, 2001). A presente pesquisa foi composta por sete sessões experimentais (ver FIGURA 1) e uma sessão de familiarização, agendadas em dias distintos, com intervalo $> 48 \text{ hrs.}$ e $< 96 \text{ hrs.}$ entre si. Cada participante compareceu ao Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Pitágoras Unopar em um mesmo horário (07:00 e 10:00), evitando-se, assim, variações circadianas (CALLARD et al., 2000). A temperatura local na coleta de dados foi termoneutra, entre 20°C e 22°C .

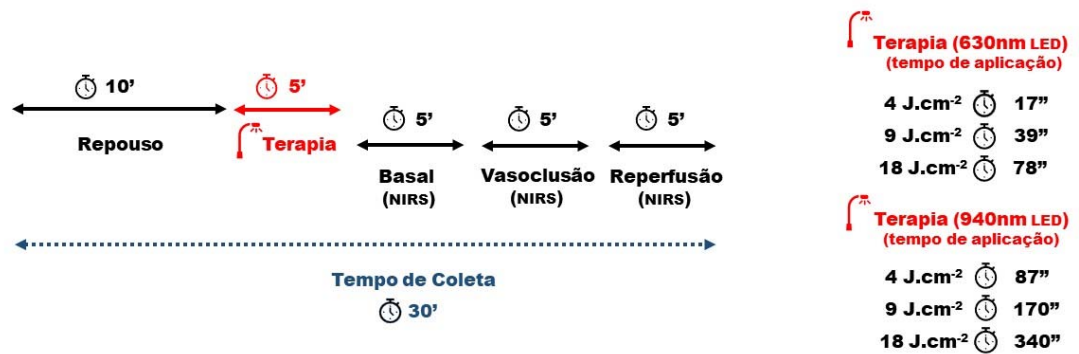


FIGURA 1 Delineamento experimental da pesquisa.

4.2.2 Sessão de Familiarização

A sessão de familiarização foi composta por avaliação da composição corporal e antropometria, conduzida por um avaliador treinado. A avaliação foi conduzida em uma sala privativa no Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Pitágoras Unopar. Estatura, definida como uma medida correspondente à distância entre região plantar e vértex da cabeça, foi determinada via estadiômetro (Sanny Standard, São Bernardo do Campo, Brasil). A massa corporal foi determinada via balança digital com precisão 0,1 KG (Toledo® 2096, São Paulo, Brasil) (GORDON et al., 1988). O índice de massa corporal (IMC; KG.M⁻²), expresso como a relação entre massa corporal (KG) e estatura (M²), foi determinado e usado como um indicador do estado nutricional. A classificação de estado nutricional seguiu as recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000). A composição corporal foi determinada usando bioimpedância elétrica (Biodynamics® 310, São Paulo, Brasil). Cada participante permaneceu, então, posicionado em decúbito dorsal para avaliação da gordura subcutânea, na região de interrogação do NIRS, usando espessimetria cutânea (VAN BEEKVELT et al., 2001).

Após avaliação antropométrica e da composição corporal, cada participante foi instruído a recordar sua ingestão alimentar nas 24 hrs. precedentes a primeira sessão experimental, replicando-a nas sessões subsequentes. Instruções sobre o adequado

preenchimento do recordatório alimentar foram fornecidas por nutricionista treinada. Todos os participantes foram instruídos a evitar atividades vigorosas e a ingestão de álcool e cafeína 12 hrs. antecedentes à realização dos testes. Todos os participantes foram ainda convidados a apresentar-se ao laboratório em um estado de adequada hidratação e jejum, evitando, assim, a ingestão de produtos cafeinados e/ou ricos em precursores do NO por um período < 3 hrs. antecedentes ao início de cada teste. Todos os inquéritos e instruções fornecidas aos participantes foram conduzidos em uma sala privativa no Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Pitágoras Unopar.

4.2.3 Sessões Experimentais






4.2.3.1 Fototerapia

Anteriormente à fototerapia, o avaliado foi posicionado em decúbito dorsal em maca com superfície não condutora, com o braço afastado do corpo onde realizou-se preparação da pele (tricotomia de pelos, abrasão e limpeza da pele com álcool). A fototerapia foi, então, conduzida por um avaliador previamente treinado após 10 min. de repouso, empregando-se método pontual de aplicação (DE ALMEIDA et al, 2011b) por contato direto do aparelho no músculo braquiorradial. Todos os voluntários foram “cegados” na presente intervenção, utilizando-se venda nos olhos e fones de ouvido. A fototerapia foi aplicada utilizando-se dois aparelhos com comprimentos de onda (λ) distintos: 630 NM (BTPYII, Bios Equipamentos Médicos, São Paulo, Brasil) e 940 NM (Laboratório de Optica e Optoeletrônica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil). As propriedades físicas de cada aparelho são apresentadas na TABELA 1.

Cabe notar que, para cada aparelho com comprimentos de onda distintos, 630 NM e 940 NM, realizou-se irradiação por LED nas doses 4 J.CM⁻², 9 J.CM⁻², e 18 J.CM⁻², além da condição placebo ou controle. O tempo de irradiação, assim, variou de acordo com o comprimento de onda e dose irradiada, conforme demonstrado na FIGURA 1. A

fototerapia nestes comprimentos de onda (630 nm e 940 nm) não produz calor e efeitos adversos à saúde (KIM et al., 2011; ROHRINGER et al., 2017). A menor densidade de energia irradiada usada na presente pesquisa foi 4 J.cm⁻², pois prévias investigações sugerem que a presente densidade energética produz efeitos protetores contra certos distúrbios fisiológicos, incluindo danos musculares ocasionados pelo exercício físico (DE ALMEIDA et al., 2011b).

TABELA 1 Propriedades físicas Bios BTPYII (630 nm) vs. LOO/UEL (940 nm).

	 Terapia 630nm LED	 Terapia 940nm LED
Comprimento de onda (nm)	630 ± 20	940 ± 40
Potência (mW)	300	140
Área do spot (cm²)	1,3	3,1
Densidade de potência (mW.cm⁻²)	230	44,5
Número de pontos	1	1
Área irradiada (cm²)	1,3	3,1
 4 J.cm⁻²		
Dose total por ponto (J)	5,1	12,5
Tempo de aplicação (seg.)	17	87
 9 J.cm⁻²		
Dose total por ponto (J)	11,7	23,8
Tempo de aplicação (seg.)	39	170
 18 J.cm⁻²		
Dose total por ponto (J)	23,4	47,6
Tempo de aplicação (seg.)	78	340

4.2.3.2 Teste de Oclusão Vascular

Após fototerapia, solicitou-se a cada participante permanecer posicionado em decúbito dorsal para execução da oclusão vascular. Basicamente, a oclusão vascular da artéria braquial foi realizada no braço dominante, o qual permaneceu supinado e abduzido em ângulo de 45°. O manguito, posicionado proximal a fossa antecubital do braço, foi inflado rapidamente através de sistema de garrote pneumático (GerarMatic, AAMED®, São Paulo, Brasil) até a pressão de 250 MMHG. Dados oriundos dos sistemas de garrote pneumático e NIRS foram monitorados para assegurar a completa oclusão arterial. De fato, a completa oclusão da artéria braquial deu-se como um platô do sinal TOTAL-[HB+MB] durante período isquêmico (BOPP et al., 2011).

4.2.3.3 Espectroscopia por Infravermelho Próximo (NIRS)

A determinação de parâmetros hemodinâmicos microvasculares e oxigenação tecidual da musculatura esquelética braquiorradial do antebraço foi realizada usando um sistema portátil NIRS (Portamon, Artinis MS, Zetten, Holanda), o qual compreende uma combinação de três diodos emissores de luz, denominados optodos, com duplo comprimento de onda (± 760 NM e ± 850 NM) e um receptor distante dos optodos cerca de 30 MM, 35 MM e 40 MM, respectivamente. A profundidade de dispersão da luz em tecidos vivos é equivalente à metade da distância entre receptor e optodo transmissor, mas depende, contudo, do tecido analisado e da sua respectiva composição (limite da dobra cutânea) e das configurações de energia do sistema NIRS (VAN BEEKVELT et al., 2001).

Os procedimentos desta pesquisa seguiram as recomendações propostas por VAN BEEKVELT et al. (2001), onde mudanças (Δ) nas concentrações de HB e MB, em particular OXY-[HB+MB], DEOXY-[HB+MB], TOTAL-[HB+MB], foram definidas por diferenças

na luz absorvida. Parâmetros hemodinâmicos microvasculares e de oxigenação tecidual na musculatura esquelética do antebraço foram reportados como mudança relativas ao período basal – ou seja, o valor médio de 60 seg. antes do final do período basal de coleta, em μM (FIGURA 1; DELOREY; KOWALCHUK; PATERSON, 2003). TOTAL-[HB+MB] foi considerado um marcador de mudanças no volume sanguíneo microvascular, enquanto OXY-[HB+MB] indicou o perfil de oxigenação local. Por fim, o DEOXY-[HB+MB], reconhecidamente independente do volume sanguíneo, foi usado como uma estimativa de extração de O_2 na musculatura esquelética na área de interesse (QUARESIMA; GRASSI, 2016). Todos os parâmetros oriundos do NIRS, OXY-[HB+MB], DEOXY-[HB+MB], e TOTAL-[HB+MB], foram monitorados durante 3 min. de repouso, 5 min. de oclusão vascular da artéria braquial no período isquêmico, e 5 min. de reperfusão, denominado hiperemia reativa, totalizando, portanto, 13 min. (FIGURA 1).

Cabe destacar que um optodo ou sensor de O_2 foi posicionado na musculatura braquiorradial do antebraço e, usando uma caneta cirúrgica, definiu-se o local exato onde o sensor de O_2 deveria ser realocado em cada sessão experimental. O optodo, envolto em uma camada plástica, densa opticamente, foi seguro na superfície da pele por uma fita, coberta por uma camada de vinil preto denso opticamente para minimizar exposição à luz externa. O sistema NIRS foi conectado a um computador por Bluetooth para a aquisição de dados (10 Hz), conversão análogo-digital, e análise subsequente dos dados (1 Hz) durante período basal e experimental (BALDARI et al., 2018; FIGURA 1). Cada voluntário permaneceu em decúbito dorsal durante toda a coleta.

Respostas dinâmicas e magnitude da ST_{O_2} foram usadas para a determinação responsividade microvascular, conforme proposta por estudos recentes em adultos saudáveis (BOPP et al., 2011; BOPP et al., 2014; McLAY et al., 2016a; ROSENBERRY et al., 2017) e pacientes (DOERSCHUG et al., 2007; SOARES; MURIAS, 2018). ST_{O_2}

basal foi determinada pelo valor médio de 60 seg. antecedentes ao começo da oclusão vascular. ST_{O_2} mínimo, por sua vez, foi definido como o menor valor durante vasocclusão, refletindo a magnitude do insulto isquêmico. ST_{O_2} máximo, por fim, foi definido como o maior valor no período de reperfusão após a liberação do garrote. ST_{O_2} basal, ST_{O_2} mínimo e ST_{O_2} máximo denotam parâmetros de magnitude da responsividade microvascular. Por sua vez, parâmetros cinéticos formam-se via curvas formadas durante períodos isquêmico (SLOPE 1) e reperfusão tecidual (SLOPE 2). O SLOPE 1 determina a taxa de desaturação tecidual. Basicamente, o sangue rico em O_2 não consegue fluir para a musculatura do antebraço, indicando que reduções na ST_{O_2} foram causadas pelo consumo de oxigênio tecidual. Desta maneira, SLOPE 1 refletiu, indiretamente, a taxa metabólica da musculatura esquelética do antebraço (ROSENBERRY et al., 2017). Por fim, o slope 2 determinou a velocidade de reperfusão da ST_{O_2} (FIGURA 2).

4.3 TRATAMENTO DOS DADOS E ESTATÍSTICA

Todos os dados foram tabulados e armazenados em um banco de dados criado no programa Microsoft® Office Access 2003. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico Statistical Package for the Social Sciences for Windows v. 22 (SPSS, IBM®, Chicago, EUA), adotando-se um nível de significância α 0,05 para todas as análises. Em ambas as etapas da dissertação, normalidade de dados foi examinada através do teste de Shapiro-Wilk. Assumindo-se pressupostos de normalidade, os dados foram tratados como média e desvio-padrão. Dados sem distribuição normal foram tratados como medianas e distribuição interquartis.

Para a análise dos dados de parâmetros hemodinâmicos microvasculares e de oxigenação tecidual, utilizou-se análises de variância (ANOVA) de dois fatores (tempo e doses irradiadas nas condições LED 4 J.CM⁻², 9 J.CM⁻² e 18 J.CM⁻², e sham) com

medidas repetidas e *post hoc* com contrastes de Bonferroni, separadamente para cada comprimento de onda (630 NM e 940 NM). O fator tempo na hemodinâmica microvascular e oxigenação tecidual foi obtido antes (*basal*) e após (*min. 3, min. 8, e min. 15*) irradiação por LED. Para dados sem distribuição normal, testes de Friedman e *post hoc* de Dunn foram usados.

Para a análise de dados de responsividade microvascular, utilizou-se ANOVA de fator único (doses irradiadas nas condições LED 4 J.CM⁻², 9 J.CM⁻² e 18 J.CM⁻², e sham) com medidas repetidas e *post hoc* com contrastes de Bonferroni, separadamente para cada comprimento de onda (630 NM e 940 NM). Parâmetros dinâmicos (SLOPE 1 e SLOPE 2) e de magnitude (ST_{O2} basal, ST_{O2} mínimo e ST_{O2} máximo) da ST_{O2}, posteriores a irradiação por LED, foram determinados.

5 RESULTADOS

A presente dissertação adotou modelo Escandinavo, onde um manuscrito científico é inserido como modo de apresentação dos principais achados da pesquisa. Portanto, a seção 5.1 é composta por um artigo original, intitulado “Does photobiomodulation by LED improve microvascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy in humans?”, a ser submetido para apreciação no renomado periódico *Lasers in Medicine and Science* (Webqualis A1).

Cabe destacar, entretanto, alguns resultados originais não inseridos no manuscrito científico mencionado acima, os quais não possuem menor importância e que servem para o embasamento das conclusões finais estabelecidas no presente documento (ver seção 6 “*conclusões finais*”). Conforme demonstrado na FIGURA 2, pode-se perceber a inexistência de efeitos da fototerapia por LED (630 NM) nos parâmetros hemodinâmicos microvasculares e de oxigenação tecidual ao longo do tempo, independentemente da dose irradiada ($P < 0.05$). De modo similar, nenhum efeito fotobiomodulador pareceu ocorrer após irradiação de luz infravermelha (940 NM) na hemodinâmica microvascular e oxigenação tecidual ao longo do tempo, e novamente, independentemente da dose energética ($P < 0.05$) (FIGURA 3).

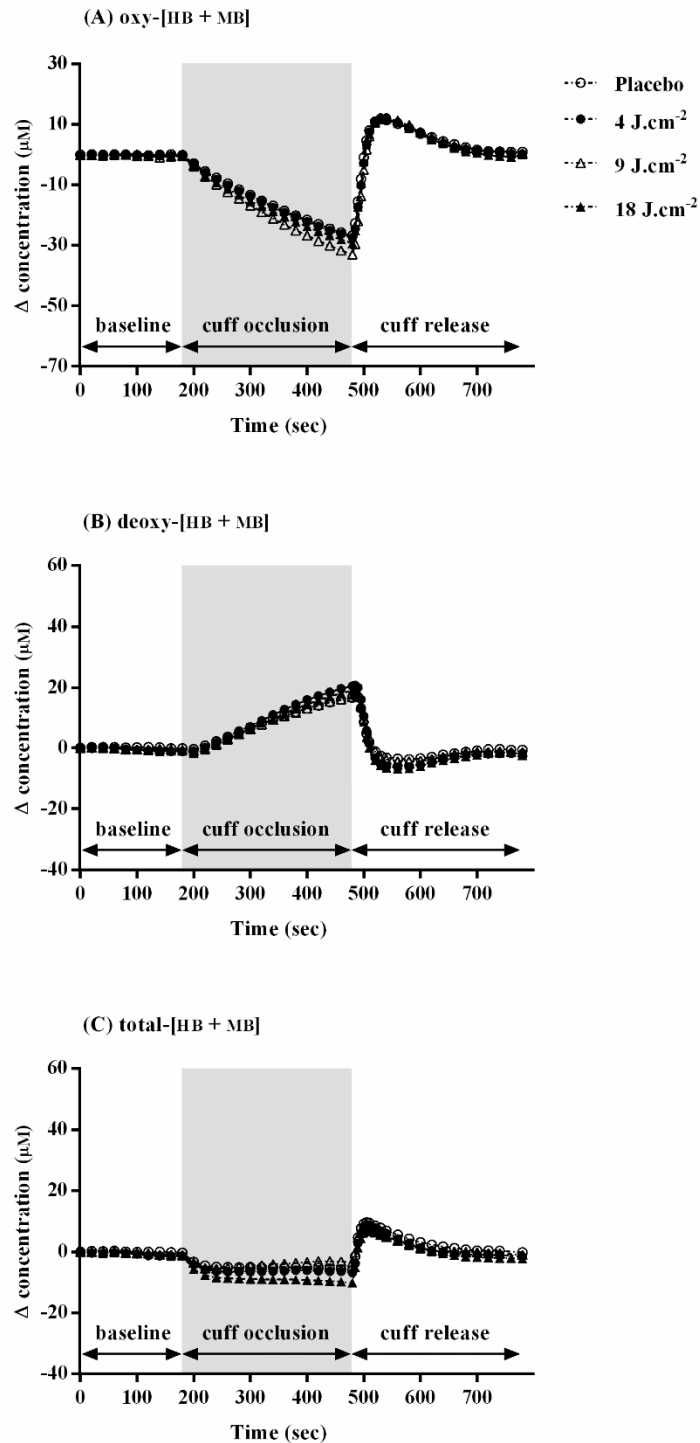


FIGURA 2 Parâmetros hemodinâmicos microvasculares e de oxigenação tecidual após fototerapia por irradiação de LED (630 nm) e placebo. Os seguintes parâmetros foram apresentados (A) OXY-[HB+MB], (B) DEOXY-[HB+MB], e (C) TOTAL-[HB+MB], em repouso e oclusão vascular. Dados são média \pm SD.

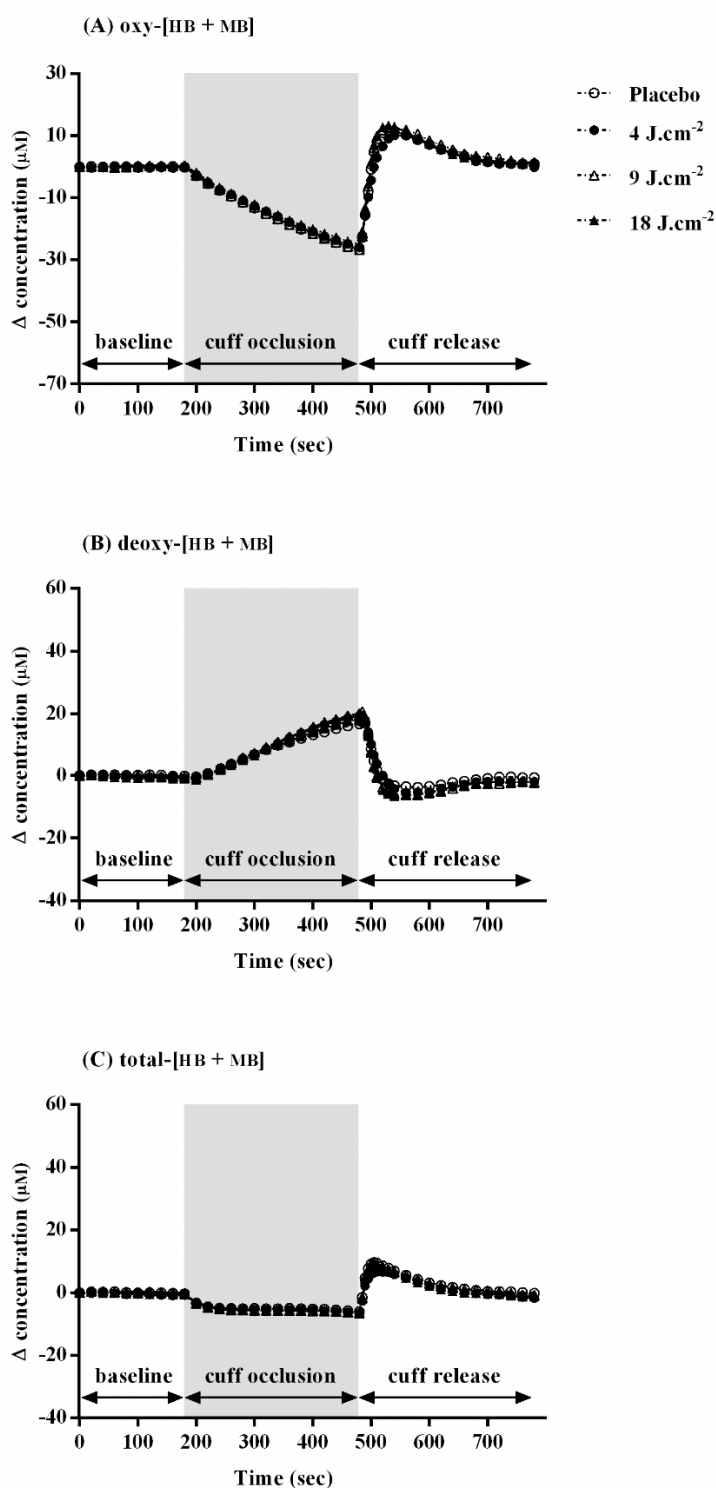


FIGURA 3 Parâmetros hemodinâmicos microvasculares e de oxigenação tecidual após fototerapia por irradiação de LED (940 NM) e placebo. Os seguintes parâmetros foram apresentados (A) OXY-[HB+MB], (B) DEOXY-[HB+MB], e (C) TOTAL-[HB+MB], em repouso e oclusão vascular. Dados são média \pm SD.

5.1 MANUSCRITO 1 - Does photobiomodulation by LED improve microvascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy in humans?

5.1.1 Abstract

Background

Experimental studies with animal models have established that photobiomodulation (PBM) stimulates microcirculation through mechanisms of enhancement of endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation. However, it is presently unknown whether these photovasorelaxation effects in microcirculation are replicated in humans. The purpose of this study was, therefore, to test the hypothesis that PBM would modulate vascular responsiveness within the human microvasculature.

Methods

Twelve healthy adult men (mean \pm SD: age 28 ± 7 yr; weight 72 ± 11 KG; height 1.73 ± 0.05 M) completed seven vascular occlusion tests (3 min of baseline, 5 min of occlusion, and 5 min post-cuff release) following a single application of sham or real PBM (red, $\lambda = 630$ NM, or infrared light-emitting diode (LED), $\lambda = 940$ NM, at energy densities of 4, 9, and $18 \text{ J}\cdot\text{CM}^{-2}$). Tissue oxygen saturation ($S_{\text{T}O_2}$) of the brachioradialis was measured using near-infrared spectroscopy (NIRS) throughout each vascular occlusion test. Vascular responsiveness within the microvasculature was determined by the $S_{\text{T}O_2}$ reperfusion rate (SLOPE 2) and the reactive hyperemia area under the curve ($S_{\text{T}O_2}\text{AUC}$).

Results

There were no significant differences in $S_{\text{T}O_2}\text{AUC}$ between the sham, 630 NM red LED, and 940 NM infrared LED conditions ($P > 0.05$ for all comparisons). There were also no between-condition differences in $S_{\text{T}O_2}$ reperfusion rates (SLOPE 2) in any comparison in this study ($P > 0.05$).

Conclusion

The findings of this study indicate that a single application of PBM, regardless of wavelength and energy density, results in no effects on human microvascular responsiveness *in vivo*.

5.1.2 Introduction

It is widely recognized that cardiovascular diseases remain one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide (Naghavi et al., 2017). The presence and severity of cardiovascular diseases are commonly associated with vascular impairments at both macro- and the microcirculatory levels (Cox et al., 1989; Zhang et al., 2000). In particular, endothelial dysfunction, a multifaceted disorder characterized by decreased ability of the endothelium to induce vasodilation in response to specific stimuli, appears to precede the development of cardiovascular abnormalities in asymptomatic adults (Langham and Wehrli, 2011). This has led to interest in accurately and noninvasively assessing endothelium-dependent vascular responses for the detection of early impairments (McLay et al., 2016a).

Traditionally, endothelium-mediated vascular responses in humans have been assessed in vivo using a well-established technique called flow-mediated dilation (FMD) (Thijssen et al., 2011). Basically, FMD is an ultrasound technique that evaluates the percent changes in arterial diameter before and after a blood flow occlusion stress. However, this technique has been criticized for being highly operator dependent and requiring sophisticated, high-cost data acquisition hardware and post-processing software (Deanfield et al., 2005). Additionally, ultrasound approaches focus entirely on upstream conduit artery vasoreactivity rather than on downstream hyperemia within the microvasculature itself (McLay et al., 2016b; Rosenberry et al., 2017). Hence, the development of novel, cost-effective methodologies to further explore endothelium-dependent microvascular responses is still warranted.

Near-infrared spectroscopy (NIRS) has emerged as a promising non-invasive method for measuring oxygen saturation and oxidative capacity in skeletal muscle tissue (Hamaoka et al., 2011; Ferrari and Quaresima, 2012; Grassi and Quaresima, 2016; Willingham and McCully, 2017). Compared with ultrasound approaches, NIRS is a simple and relatively inexpensive optical method for directly interrogating specific regions of interest (i.e., skeletal muscle). In recent years, a large amount of research has been devoted to the study of dynamic, NIRS-derived measures of tissue oxygen saturation (S_{T02}) following circulatory occlusion in patients (Kragelj et al., 2001; Doerschug et al., 2007; Haertel et al., 2018; Soares and Murias, 2018)

and healthy, young subjects (McLay et al., 2016a; McLay et al., 2016b; Soares et al., 2017). Collectively, these studies suggest that $S_{\text{T}O_2}$ post-occlusion recovery kinetics might serve as a valid and reliable approach to evaluate microvascular responsiveness in vivo (McLay et al., 2016a; Rosenberry et al., 2017). The inherent characteristics of this relatively novel and robust approach may extend our understanding of the endothelium-dependent microvascular function in both healthy and diseased humans.

Photobiomodulation (PBM), formerly known as low-level light (or laser) therapy, is the low power (10-500 mW) non-thermal delivery of photons in the red or near infrared spectrum ($\lambda \approx 600\text{-}1000$ nm) that elicits a myriad of biological responses in cells and tissues from animals and humans (Mandel and Hamblin, 2012). Within the last few decades, PBM has been proven to be effective in a wide variety of clinical indications, such as pain attenuation, wound healing, and neuroinflammation, among others (Kim and Calderhead, 2011). Strikingly, mechanisms underlying the association between low-level light irradiation and favorable therapeutic outcomes remain poorly understood but may include photomodulation effects on the microcirculation (Maegawa et al., 2000). Experimental investigations with animal models indicate that irradiation with both red or near-infrared light stimulates microcirculation through mechanisms of enhancement of endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation (Chaudhry et al., 1993; Maegawa et al., 2000; Andrews et al., 2003; Plass et al., 2012). A few previous studies have suggested that these photovasorelaxation effects on microcirculation are replicated in humans (Samoilova et al., 2008; Larkin et al., 2012; Frangez et al., 2017). However, it should be noted that these earlier human studies focused entirely on large conduit arteries and other easily accessible peripheral vascular beds, such as skin, rather than on microvessels within skeletal muscle itself, which are of paramount importance in clinical practice and research (Frisbee et al., 2018). Hence, further research is required to examine whether low-level light irradiation can modulate microvascular function within human skeletal muscle tissue.

Using the aforementioned NIRS-derived approach, combined with circulatory occlusion, we empirically tested the hypothesis that PBM would modulate vascular responsiveness within skeletal muscle microvasculature in humans. Specifically, we hypothesized that, compared

with sham, a single application of PBM by red ($\lambda = 630 \text{ NM}$) or infrared ($\lambda = 940 \text{ NM}$) light-emitting diode (LED) at different energy densities (4, 9, and $18 \text{ J}\cdot\text{CM}^{-2}$) would improve vascular reactivity in a group of apparently healthy, young adults. However, as no study has examined the effects of PBM on indices of microvascular function in humans, our hypothesis is more exploratory in nature.

5.1.3 Material and Methods

5.1.3.1 Ethical Approval

The current study was reviewed and approved by the Institutional Review Board committee of the North University of Paraná and conducted in accordance with the latest revision of the Declaration of Helsinki. All subjects gave their written, informed consent prior to the commencement of the study, once the experimental procedures, associated risks, and potential benefits of participation had been explained in detail. The present study was not registered in a database.

5.1.3.2 Subjects

Twelve healthy young adult men (mean \pm SD: age $28 \pm 7 \text{ yr}$; weight $72 \pm 11 \text{ KG}$; height $1.73 \pm 0.05 \text{ M}$) were recruited to participate in this study. The current study was limited to men due to sex differences in the control of vascular tone (Orshal and Khalil, 2004). All subjects reported being in good health and none of them presented medical contraindications for participation in the study. All subjects were normotensive (mean \pm SD: systolic blood pressure $116 \pm 10 \text{ MM HG}$ and diastolic blood pressure $75 \pm 6 \text{ 10 MM HG}$) and had no history of cardiovascular, respiratory, or musculoskeletal diseases. None of the subjects were tobacco smokers or used any dietary supplementation or medication that could affect microvascular function. All subjects were recreationally active (three or more exercise sessions per week), but not highly trained.

5.1.3.3 Experimental design

All subjects reported to the laboratory on eight separate occasions over a 4-wk period that included one preliminary visit and seven experimental visits. During the first visit to the laboratory, subjects were familiarized with the testing procedures employed in the study. Resting blood pressure (BP) of the brachial artery was also measured in a seated position using an automated sphygmomanometer (Carescape V100; GE Medical Systems, Milwaukee, USA) after subjects had rested in an isolated room for a period of 10 min. Four measurements were recorded, and the mean of the final three measurements was used for data analysis (Pickering et al., 2005). After the preliminary visit, each participant returned to the laboratory on seven separate occasions and was exposed to single application of sham or real PBM (red, $\lambda = 630$ NM, or infrared light-emitting diode (LED), $\lambda = 940$ NM, at energy densities of 4, 9, and $18 \text{ J}\cdot\text{CM}^{-2}$), in a randomized counterbalanced order (see below for further details). Each experimental visit was performed at approximately the same time of the day (± 2 h) for each subject, in a quiet, temperature-controlled room ($21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). All subjects were instructed to arrive at the laboratory in a rested and fully hydrated state, at least 3h postprandial, and not to consume alcohol and caffeine for at least 12-h prior to each experimental visit. They were also asked to abstain from strenuous exercise for at least 24-h prior to each visit to the laboratory. Throughout the study period, subjects were instructed to maintain their normal daily activities and food and fluid intake. Compliance with these instructions was determined at the beginning of each experimental visit.

5.1.3.4 Photobiomodulation (PMBT)

Before the start of each experiment, subjects were required to remain in the supine position on a medical plinth for at least 10 min. After trichotomy and skin cleaning, they received a single application of sham or real PBM with red (630 NM) and infrared (940 NM) LED at different energy densities (4, 9, and $18 \text{ J}\cdot\text{CM}^{-2}$), in a counterbalanced order. These 'doses' – wavelengths and energy densities – were chosen based on previous research (Barolet, 2008; Chung et al., 2009; see Discussion for further details) and are summarized in TABLE 2. The PBM sequence

was in accordance with the randomization¹ procedure. All LED exposure sessions were performed on the brachioradialis muscle belly of the right forearm, which was identified using palpation by a trained researcher. The LED devices were calibrated before the study, according to the manufacturer's recommendation.

To ensure blinding, subjects wore headphones playing white noise to mask any sounds from the LED devices and were blindfolded with a sleep eye mask for the duration of the light exposure. An assistant researcher who was not directly involved in the study conducted the randomization. This researcher was instructed to configure the LED devices in accordance with the randomization results and not to inform the participants and other researchers – including the technician in charge of the application of the light – regarding the PBM 'dose' (De Almeida et al., 2012).

TABLE 2 PBMT parameters.

	LED 630 NM	LED 940 NM
No. LED	1	1
Wavelength (NM)	630 ± 20	940 ± 40
LED spot size (CM ²)	1.3	3.1
Power density per LED (MW.CM ⁻²)	230	44.5
4 J·CM ⁻²		
Irradiation time (SEC)	17	87
Total energy per application (J)	5.1	12.5
9 J·CM ⁻²		
Irradiation time (SEC)	39	170
Total energy per application (J)	11.7	23.8
18 J·CM ⁻²		
Irradiation time (SEC)	78	340
Total energy per application (J)	23.4	47.6

5.1.3.5 Vascular Occlusion Test

Twenty minutes after arrival at the laboratory (5 min after light irradiation), subjects completed a vascular occlusion test (McLay et al., 2016a; Rosenberry et al., 2017). With the subject's arm resting on a bedside table in a supinated and slightly abducted position, the NIRS apparatus was secured on the brachioradialis muscle. A pneumatic cuff positioned around the brachial region of the arm and connected to an automatic rapid inflation system (GerarMatic, AAMED®, São Paulo, Brazil) was used for occlusion. For each vascular occlusion test, the cuff was rapidly inflated (within 2 sec) to suprasystolic pressures (~250 MMHG) for the entire occlusion time. Complete occlusion of the brachial artery was assumed if the NIRS-derived total hemoglobin + myoglobin (TOT-[HB + MB]) signal did not increase more than 10% following cuff inflation (Bopp et al., 2014). NIRS measurements were collected continuously during 3 min of rest, 5 min of brachial artery occlusion, and 5 min following cuff release. Total collection time per vascular occlusion test was therefore 13 min.

5.1.3.6 Near-infrared spectroscopy

The ST_{O_2} of the brachioradialis muscle was monitored continuously using a portable continuous wave NIRS system (Portamon, Artinis Medical System, Elst, The Netherlands). The NIRS apparatus emits light at 760 nm and 850 nm wavelengths from three optodes, with an average optode-detector distance of 35 mm. Penetration depth of the light into tissue was estimated at 17.5 mm, or approximately half the distance between the optode and the detector (Van Beekvelt et al., 2001). The NIRS system simultaneously uses the modified Beer-Lambert and spatially resolved spectroscopy methods to measure changes in oxygenated (OXY-[HB + MB]) and deoxygenated hemoglobin + myoglobin (DEOXY-[HB + MB]) within the skeletal muscle microvasculature. As such, ST_{O_2} , expressed as a percentage in arbitrary units (%A.U.), can be calculated $(OXY-[HB + MB] / TOTAL-[HB + MB])$. The NIRS apparatus was secured on the forearm muscle and covered with black tape to prevent contamination from ambient light. A surgical marker pen was used to mark apparatus placement for accurate repositioning throughout the study sessions. Skinfold thickness at the site of application of the NIRS apparatus was

determined by a trained researcher during the preliminary visit, using a Harpenden skinfold caliper (British Indicators, Burgess Hill, UK). The calculated value of the combined adipose tissue and skin thickness was less than one-half the distance between the optode and the (Ferrari et al., 2004). The NIRS system was connected by Bluetooth to a personal computer for data acquisition (10 HZ), analog-to-digital conversion, data reduction to 1-sec time detector bins, and subsequent analysis (Baldari et al., 2018).

The NIRS-derived ST_{O_2} parameters calculated are illustrated in FIG.4. Baseline ST_{O_2} , expressed as a percentage in arbitrary units (%A.U.), was determined as the average of 1 min of ST_{O_2} prior to ischemia. Minimum ST_{O_2} (%A.U.), an indicator of the magnitude of the ischemic insult (the stimulus to vasodilate; Rosenberry et al., 2017), was determined as the lowest ST_{O_2} value attained during ischemia. The desaturation rate (ST_{O_2} SLOPE1) during ischemia, an indirect measure of skeletal muscle metabolic rate (Doerschug et al., 2007), was quantified as the downslope of ST_{O_2} measured from 30 to 150 sec following the cuff inflation and expressed as a percentage in arbitrary units per second (%A.U. \cdot SEC⁻¹; McLay et al., 2016a). The ST_{O_2} reperfusion rate (%A.U. \cdot SEC⁻¹; ST_{O_2} SLOPE2) was quantified as the upslope of the ST_{O_2} signal over a 10 sec window period immediately following release of arterial occlusion. Peak ST_{O_2} (%A.U.) was determined as the highest ST_{O_2} value reached after cuff release (McLay et al., 2016c). Lastly, the ST_{O_2} reactive hyperemia area under the curve (ST_{O_2} AUC; %A.U. \cdot SEC⁻¹) was calculated from the time of cuff release to 2 min post cuff occlusion, while hyperemic reserve was calculated as the percentage change in peak ST_{O_2} from baseline (%A.U.; Rosenberry et al., 2017).

5.1.3.7 Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SD, unless otherwise stated. Normality of all data was checked by the Shapiro-Wilk test. Differences in NIRS-derived ST_{O_2} parameters were analyzed using one-factor, within-subjects, repeated-measures ANOVA to examine the effects of PBM with red (630 NM) and infrared (940 NM) LED at different energy densities (4, 9, and 18 J \cdot CM⁻²). Post hoc analysis was completed using the Bonferroni test for multiple comparisons. The null hypothesis

was rejected when $P < 0.05$. Effect sizes (partial eta squared, η_p^2 ; Cohen, 1988) are included, together with P values, where appropriate. Statistical analyses were performed using a commercially available software package (SPSS for Windows version 24.0, IBM®, Chicago, USA).

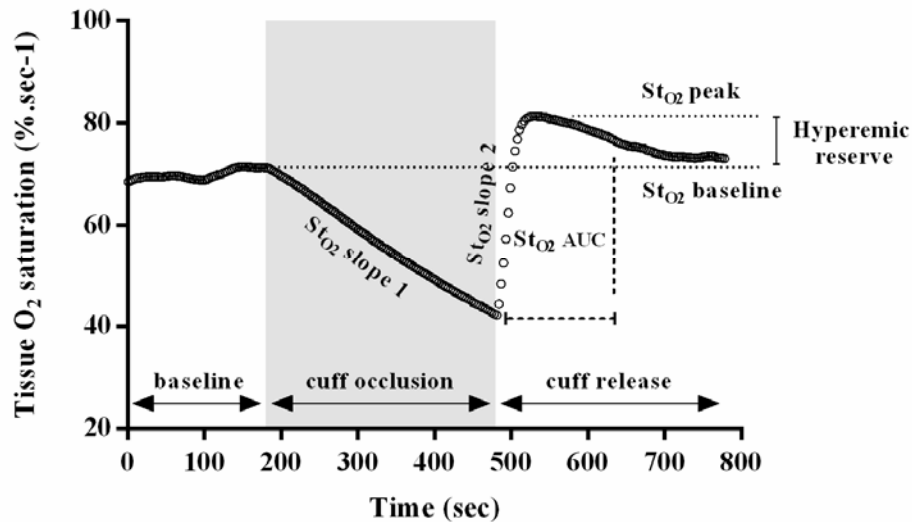


FIGURE 4 NIRS-derived profile of $S_{T_{O_2}}$ (%a.u.) for a representative subject measured during a vascular occlusion test. NIRS-derived parameters of $S_{T_{O_2}}$ are highlighted to illustrate what was calculated for each subject.

5.1.4 Results

All subjects completed the seven experimental visits. Participants reported similar habitual physical activity patterns and dietary intake in the 24-h prior to each visit to the laboratory. The PBM conditions were well tolerated by the subjects, and no harmful side effects were reported.

5.1.4.1 PBM with 630 NM red LED

The NIRS-derived measures of $S_{T_{O_2}}$ following circulatory occlusion for the PBM with 630 NM red LED conditions are depicted in FIG.5. There were no significant between-condition differences for the baseline $S_{T_{O_2}}$ (66.3 ± 5.2 , 67.2 ± 4.7 , 67.3 ± 3.7 , and $66.9 \pm 5.0\%$ for sham, 4, 9, and 18

$\text{J}\cdot\text{CM}^{-2}$, respectively; $\eta_p^2 = 0.03$) and the lowest S_{TO_2} value attained during ischemia, $S_{\text{TO}_2\text{MIN}}$ ($\eta_p^2 = 0.06$; FIG. 5A) ($P > 0.05$). In addition, no significant differences in the $S_{\text{TO}_2\text{SLOPE 1}}$ ($\eta_p^2 = 0.16$; FIG. 5C) were observed across the experimental conditions. Surprisingly, and in contrast with our hypothesis, no significant photobiomodulation effects were found for the NIRS-derived parameters of microvascular responsiveness, $S_{\text{TO}_2\text{PEAK}}$ ($\eta_p^2 = 0.03$; FIG. 5B), $S_{\text{TO}_2\text{SLOPE2}}$ ($\eta_p^2 = 0.05$; FIG. 5D), $S_{\text{TO}_2\text{AUC}}$ ($\eta_p^2 = 0.05$; FIG. 5F), and hyperemic reserve ($\eta_p^2 = 0.01$; FIG. 5E) ($P > 0.05$; see FIG.6 for further details).

5.1.4.2 PBM with 940 NM infrared LED

The NIRS-derived measures of S_{TO_2} following circulatory occlusion for the PBM with 940 NM infrared LED conditions are depicted in FIG.7. Baseline S_{TO_2} (66.3 ± 5.2 , 63.1 ± 8.0 , 67.0 ± 4.6 , and $66.2 \pm 5.2\%$ for sham, 4, 9, and 18 $\text{J}\cdot\text{CM}^{-2}$, respectively; $\eta_p^2 = 0.15$) was not significantly different between conditions ($P > 0.05$). There were also no between-condition differences for the $S_{\text{TO}_2\text{MIN}}$ ($\eta_p^2 = 0.17$; FIG. 7A) and $S_{\text{TO}_2\text{SLOPE 1}}$ ($\eta_p^2 = 0.07$; FIG. 7C) ($P > 0.05$). Similarly, no significant photobiomodulation effects were found for the NIRS-derived measures of microvascular responsiveness, $S_{\text{TO}_2\text{PEAK}}$ ($\eta_p^2 = 0.05$; FIG. 7B), $S_{\text{TO}_2\text{SLOPE 2}}$ ($\eta_p^2 = 0.12$; FIG. 7D), $S_{\text{TO}_2\text{AUC}}$ ($\eta_p^2 = 0.04$; FIG. 7F), and hyperemic reserve ($\eta_p^2 = 0.10$; FIG. 7E) ($P > 0.05$; see FIG.8 for further details).

5.1.5 Discussion

This study examined the acute effects of PBM on vascular responsiveness within the skeletal muscle microvasculature in humans. Specifically, we studied how a single application of PBM with red (630 NM) or infrared (940 NM) LED at different energy densities (4, 9, and 18 $\text{J}\cdot\text{CM}^{-2}$) modulates NIRS-derived post-occlusion S_{TO_2} kinetics in a group of healthy, young adults. The principal original finding of this investigation was that, compared with sham, neither the S_{TO_2} reperfusion rate (SLOPE 2) nor the reactive hyperemia area under the curve ($S_{\text{TO}_2\text{AUC}}$) were

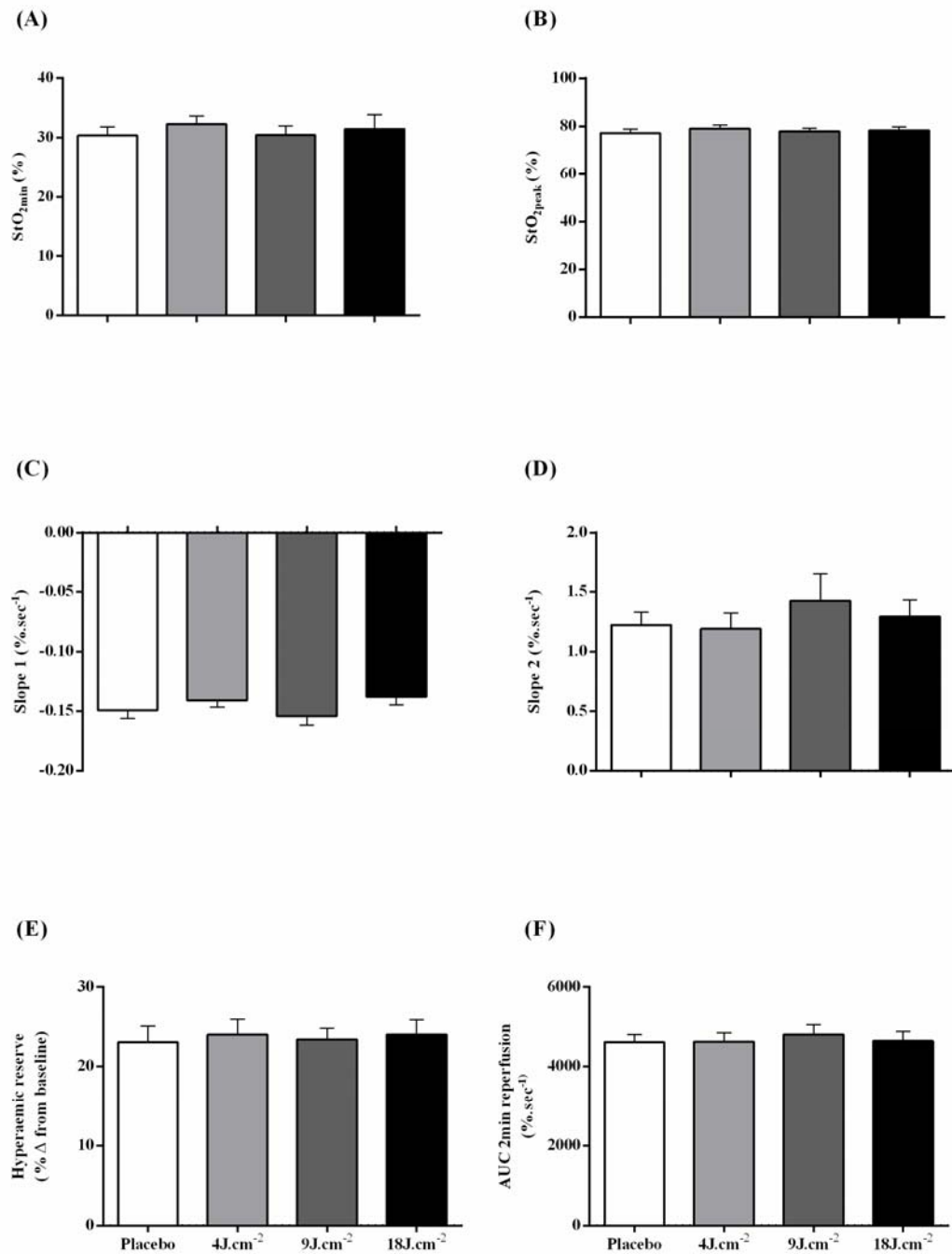


FIGURE 5 Group mean NIRS-derived S_{TO2} data for sham and PBM with 630 nm red LED. The following are shown (A) S_{TO2MIN} , (B) $S_{TO2PEAK}$, (C) $S_{TO2SLOPE 1}$, (D) $S_{TO2SLOPE 2}$, (E) hyperaemic reserve, and (F) S_{TO2AUC} data during vascular occlusion test following sham (white bar) and irradiation with red LED at energy densities of 4 J·cm⁻² (light gray bar), 9 J·cm⁻² (dark gray bar), and 18 J·cm⁻² (black bar). Values are means \pm SE.

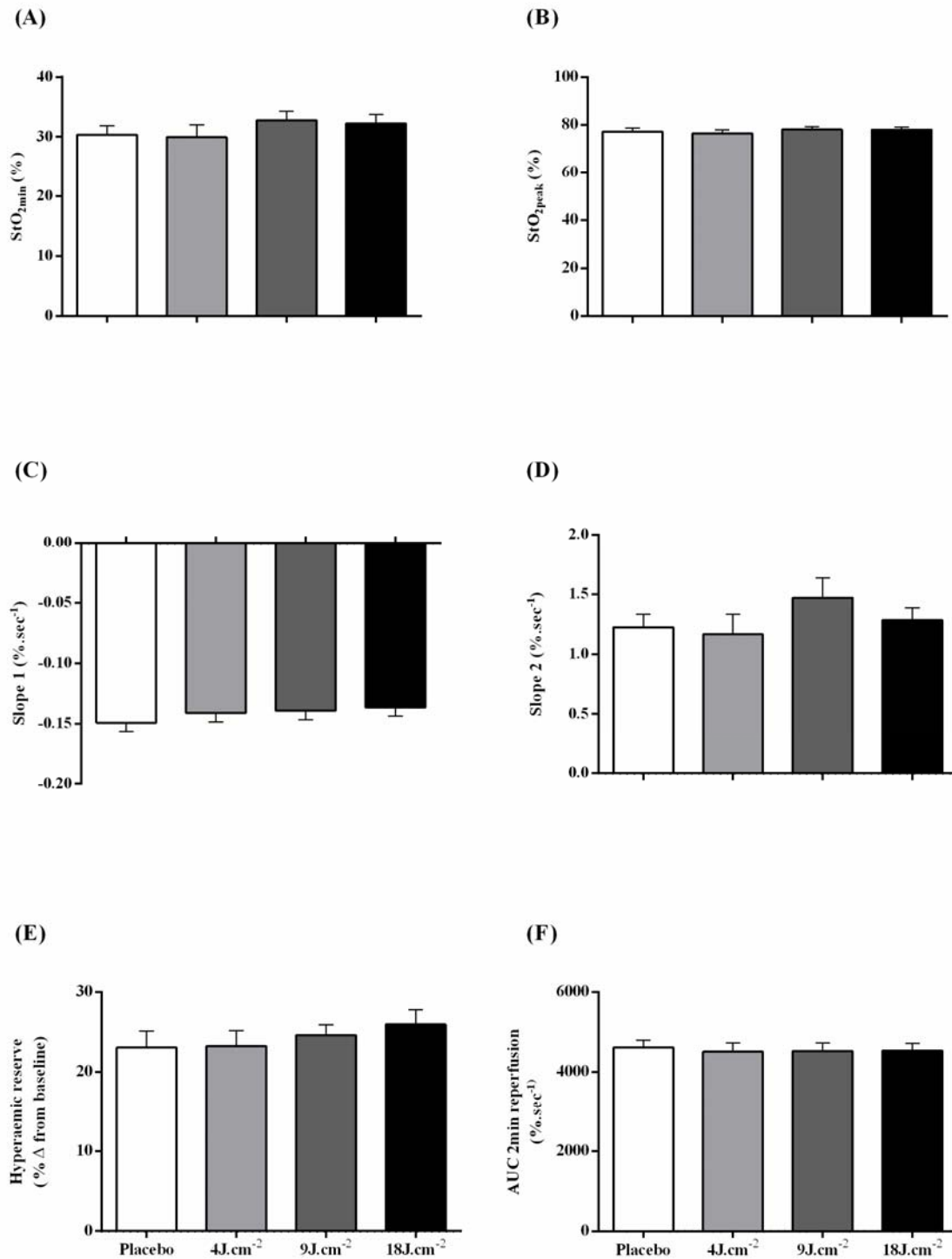


FIGURE 7 Group mean NIRS-derived S_{T02} data for sham and PBM with 940 nm infrared LED. The following are shown (A) S_{T02MIN} , (B) $S_{T02PEAK}$, (C) $S_{T02SLOPE 1}$, (D) $S_{T02SLOPE 2}$, (E) hyperaemic reserve, and (F) S_{T02AUC} data during vascular occlusion test following sham (white bar) and irradiation with red LED at energy densities of 4 $J \cdot cm^{-2}$ (light gray bar), 9 $J \cdot cm^{-2}$ (dark gray bar), and 18 $J \cdot cm^{-2}$ (black bar). Values are means \pm SE.

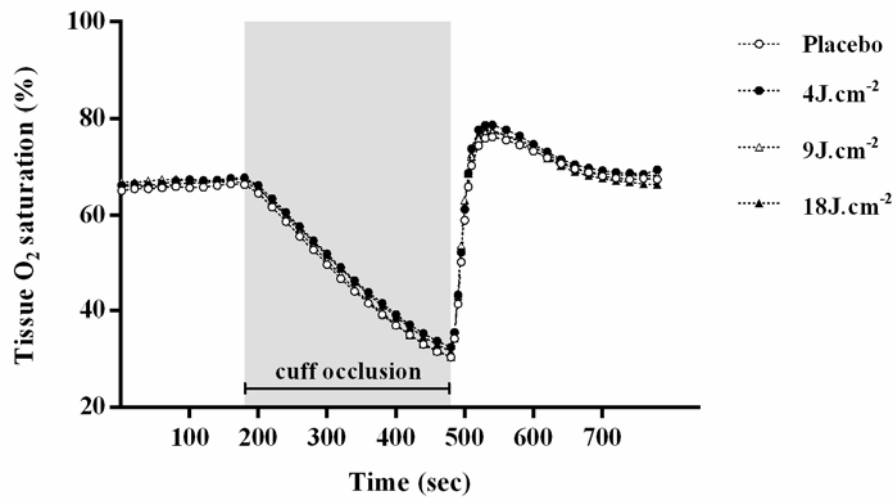


FIGURE 6 Group mean NIRS-derived $S_{T_{O_2}}$ data for sham and real PBM with 630 NM red LED. Shown are $S_{T_{O_2}}$ data during vascular occlusion test following sham (white circle) and irradiation with red LED at energy densities of $4\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (black circle), $9\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (white triangle), and $18\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (black triangle).

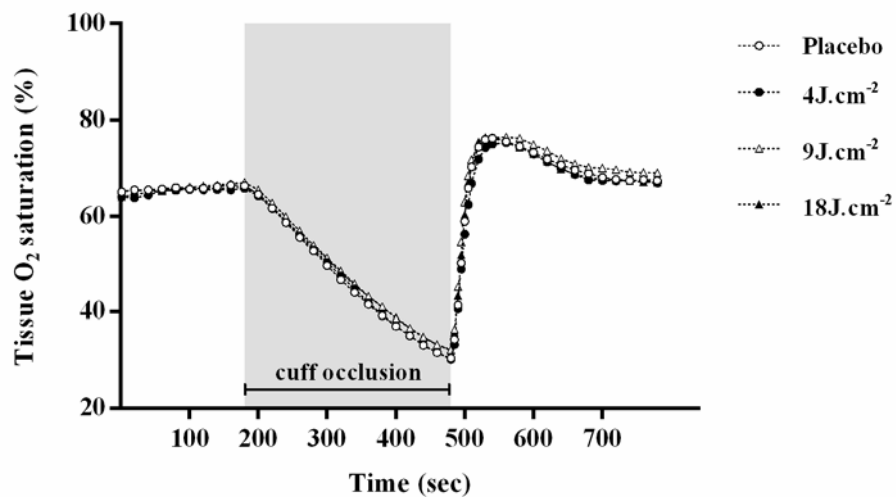


FIGURE 8 Group mean NIRS-derived $S_{T_{O_2}}$ data for sham and real PBM with 940 NM infrared LED. Shown are $S_{T_{O_2}}$ data during vascular occlusion test following sham (white circle) and irradiation with red LED at energy densities of $4\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (black circle), $9\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (white triangle), and $18\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (black triangle).

significantly altered after light irradiation, regardless of wavelength and energy density. This finding differs from previous research, demonstrating that PBM can stimulate microcirculation through mechanisms of enhancement of endothelium-dependent and/or endothelium-independent vasodilation in animals (Chaudhry et al., 1993; Maegawa et al., 2000; Andrews et al., 2003; Plass et al., 2012) and humans (Samoilova et al., 2008; Larkin et al., 2012; Frangez et al., 2017).

Several theories have been proposed on how PBM could exert effects (see Chung et al., 2009 for review). The precise mechanisms behind the photobiomodulation effect of low-level light irradiation are still unclear but are likely to be related to changes in the microcirculation. A traditional hypothesis for the effect of PBM on microcirculation is that light irradiation stimulates the production and release of nitric oxide (NO), a ubiquitous signaling molecule which is believed to play a crucial role in the regulation of vascular tone (Chaudhry et al., 1993; Andrews et al., 2003). Once released from the endothelium, NO readily diffuses into the adjacent smooth muscle cells to initiate vasodilation within the microvasculature (Furchgott and Jothianandan, 1991). Prior evidence suggests that light irradiation may cause release of NO not only from the endothelium, but also from nitrosylated forms of both hemoglobin and myoglobin, leading to vasodilation (Lohr et al., 2009). Despite these different pathways for NO synthesis and/or release, the results of the present study do not support the notion of improved endothelium-dependent and/or endothelium independent vasorelaxation induced by light irradiation, at least in healthy, young adults undergoing the PBM procedures employed in this investigation.

Reactive hyperemia is the sudden rise in blood flow, above basal levels, after release of an arterial occlusion. Basically, hyperemic responses to circulatory occlusion are believed to describe endothelium-dependent and/or endothelium-independent vasodilation (Dora et al., 2000), which appears to be related to the increase in internal-wall shear stress along the vessel combined with elevation of luminal blood flow after release of the cuff. Hence, assessment of the magnitude and rate of the hyperemic response to arterial occlusion are becoming increasingly important for evaluating the relative health of the microvasculature in both diseased and healthy populations (McLay et al., 2016a; McLay et al., 2016b; Rosenberry et al., 2017). Combined with circulatory occlusion, NIRS has recently emerged as a simple and

relatively inexpensive optical method capable of non-invasive determination of downstream vascular hyperemia within the skeletal muscle microvasculature (Bopp et al., 2011). As such, NIRS-derived measures of S_{TO_2} following circulatory occlusion are currently considered a valid and reliable approach to evaluate microvascular responsiveness in vivo (McLay et al., 2016a; Rosenberry et al., 2017). Using the aforementioned approach, we demonstrated that PBM did not significantly modulate microvascular reactivity in humans. Following a period of circulatory occlusion, not only S_{TO_2} SLOPE2 and ST_{O_2} AUC, but also S_{TO_2PEAK} and hyperemic reserve, were unaffected by light irradiation (see FIGS. 5-8 for details), suggesting no photobiomodulation effect in terms of the rate and amount of vascular adjustment after release of the cuff. Whether the absence of any significant photovasorelaxation effect observed in the present study might be attributed, at least in part, to the lack of efficacy of the PBM *per se* remains to be elucidated.

Another interesting observation in the current study was that the desaturation rate (ST_{O_2} SLOPE 1) during ischemia did not differ across the experimental conditions. As oxygen-rich blood is trapped in the arm with occlusion, any reduction in ST_{O_2} is directly related to oxygen consumption by skeletal muscle tissue. Thus, NIRS-derived parameters of ST_{O_2} SLOPE 1 can be considered an indirect measure of skeletal muscle metabolic rate (Doerschug et al., 2007). The apparent lack of photobiomodulation effect on skeletal muscle resting metabolic rate found in the present study could be somewhat expected, as ST_{O_2} SLOPE 2, which is directly related to the metabolic “accumulation” during ischemia (De Blasi et al., 1994), was similarly unaffected by PBM. The mechanisms underlying the absence of a PBM effect on ST_{O_2} SLOPE 1 are unknown, but may be related, in part, to the mitigated photodissociation of NO from the cytochrome c oxidase (CCO), a large transmembrane protein complex which is believed to play a pivotal role in cellular respiration (Karu et al., 1995). When dissociated from NO, CCO readily upregulates cellular respiration by increasing the production of adenosine tri-phosphate (ATP) in the mitochondria. This hypothesis is naturally speculative and awaits further investigation.

A possible explanation for the failure to improve microvascular function with PBM could be related, in part, to the experimental procedures used in this study. Although the effective tissue penetration of the irradiated light is maximized in the red and infrared spectrum ($\lambda = \sim 600\text{-}1000$ NM), microcirculation function is likely to be more sensitive to shorter wavelengths (Rohringer

et al., 2017). Prior evidence suggests that light can trigger the release of NO from the endothelium and/or from nitrosylated forms of both hemoglobin and myoglobin in a wavelength-dependent manner, with shorter wavelengths being more efficient (Mittermayr *et al.*, 2007; Dungenl *et al.*, 2008). Therefore, future studies with different wavelengths and PBM parameters of 'dosimetry', including energy density, are necessary to further examine the relationship between light irradiation and favorable microvascular benefits in humans.

This study provides the first description of the acute effects of PBM with red or infrared LED on microvascular function within skeletal muscle tissue in humans. Our results suggest that this relatively simple, non-invasive technique would not be effective to improve microvascular responsiveness measures derived from NIRS. These findings have important implications for the use of PBM to stimulate vascular reactivity in healthy, young adults. Whether differences in wavelengths and energy densities would produce dissimilar photobiomodulation effects on microvascular function cannot be concluded and should be a topic of future studies.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, os achados da presente dissertação demonstraram que a responsividade microvascular não é modulada pela fototerapia, sendo independente do comprimento de onda e dose irradiada. Baseado nos resultados expostos na pesquisa inclusa nesta dissertação, conclui-se que a fototerapia é uma estratégia potencialmente ineficaz na modulação da função microvascular e otimização da saúde vascular em humanos.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, JD, et al. Time course of improved flow-mediated dilation after short-term exercise training. **Med Sci Sports Exerc** 35:847-853, 2003.
- ANDREWS, K; McGUIRE, J; TRIGGLE, C. A photosensitive vascular smooth muscle store of nitric oxide in mouse aorta: no dependence on expression of endothelial nitric oxide synthase. **Br J Pharmacol** 138:932-940, 2003.
- ANDERS, JJ; LANZAFAME, RJ; ARANY, PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomed Laser Surg** 33:183–184, 2015.
- ANTONIALLI, FC, et al. Phototherapy in skeletal muscle performance and recovery after exercise: effect of combination of super-pulsed laser and light-emitting diodes. **Lasers Med Sci** 29:1967-1976, 2014.
- BALDARI, C, et al. Effects of transcranial direct current stimulation on psychophysiological responses to maximal incremental exercise test in recreational endurance runners. **Front Psychol** 9:1867, 2018.
- BALL, KA; CASTELLO, PR; POYTON, RO. Low intensity light stimulates nitrite-dependent nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by cytochrome c oxidase: implications for phototherapy. **J Photochem Photobiol b Biol.** 102:182–191, 2011.
- BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Semin Cutan Med Surg.** 27: 227-238, 2008.
- BOPP, CM, et al. A Relationship between brachial artery blood flow and total [hemoglobin+myoglobin] during post-occlusive reactive hyperemia. **Microvasc Res** 91:37-43, 2014.
- BOPP, CM; TOWNSEND, DK; BARSTOW, TJ. Characterizing near-infrared spectroscopy response to forearm post-occlusive reactive hyperemia in healthy subjects. **Eur J Appl Physiol** 111:2753-2761, 2011.
- BRINDLEY, GS. The Bunsen-Roscoe law for the human eye at very short durations. **J Physiol** 118:135–139, 1952.
- CALLARD, D, et al. Circadian rhythms in human muscular efficiency: continuous physical exercise versus continuous rest. A cross-over study. **Chronobiol Int** 17:693-704, 2000.
- CARDINAL, BJ; CARDINAL, MK. Preparticipation physical activity screening within a racially diverse, older adult sample: Comparison of the origin and revised Physical Activity Readiness Questionnaire. **Res Q Exerc Sport** 71:302-307, 2000.
- CARVALHO, T, et al. Posição oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: atividade física e saúde. **Rev Bras Med Esp** 2:79-81, 1996.

CHAUDHRY, H, et al. Relaxation of vascular smooth muscle induced by low-power laser radiation. **Photochem Photobiol** 58:661-669, 1993.

CHUNG, H., et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng.** 40: 516-533, 2011.

CLARENBACH, CF; SIEVI, NA; KOHLER, M. Annual progression of endothelial dysfunction in patients with COPD. **Resp Med** 132:15-20, 2017.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Diretrizes e normas regulamentadoras sobre pesquisa envolvendo seres humanos**. Resolução 196. Brasília: CNS, 1996

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Normas de pesquisa em saúde**. Resolução 01. Brasília: CNS, 1998.

COOPER, CE. Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? **Trends Biochem Sci** 27:33–39, 2002.

COX, DA, et al. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. **Circulation** 80:458-465, 1989.

CURRIE, KD; MCKELVIE, RS; MACDONALD, MJ. Flow-mediated dilation is acutely improved after high-intensity interval exercise. **Med Sci Sports Exerc** 44:2057-2064, 2012.

DE ALMEIDA, P, et al. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. **Photochem Photobiol** 87:1159-1163, 2011a.

DE ALMEIDA, P, et al. Red (660 nm) and infrared (830 nm) low-level laser therapy in skeletal muscle fatigue in humans: what is better? **Lasers Med Sci** 27:453–458, 2011b.

DEANFIELD, J.; et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. **J Hypertens.** 23: 7-17, 2005.

DE BLASI, RA; et al. Noninvasive measurement of forearm blood flow and oxygen consumption by near-infrared spectroscopy. **J Appl Physiol.** 76: 1388-1393, 1994.

DEJAM, A, et al. Emerging role of nitrite in human biology. **Blood Cells Mol Dis** 32:423-429, 2004.

DELOREY, DS; KOWALCHUK, JM; PATERSON, DH. Relationship between pulmonary O₂ uptake kinetics and muscle deoxygenation during moderate-intensity exercise. **J Appl Physiol** 95:113-120, 2003.

DOERSCHUG, KC, et al. Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 293:H165-H1071, 2007.

DORA, KA; DAMON, DN; DULING, BR. Microvascular dilation in response to occlusion: a coordinating role for conducted vasomotor responses. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 279: H279–H284, 2000.

DUNGEL, P; et al. Illumination with blue light reactivates respiratory activity of mitochondria inhibited by nitric oxide, but not by glycerol trinitrate. **Arch Biochem Biophys**. 471: 109-115, 2008.

FERRARI, M; MOTTOLA, L; QUARESIMA, V. Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy. **Can J Appl Physiol** 29:463–487, 2004.

FERRARI, M; QUARESIMA, V. A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application. **Neuroimage** 63:921-935, 2012.

FRANGEZ, I, et al. The effect of LED on blood microcirculation during chronic wound healing in diabetic and non-diabetic patients: a prospective, double-blind randomized study. **Lasers Med Sci** 32:887-894, 2017.

FRISBEE, JC; LEWIS, MT; WISEMAN, RW. Skeletal muscle performance in metabolic disease: Microvascular or mitochondrial limitation or both? **Microcirculation** 2018 [ahead of print]

FURCHGOTT, RF; JOTHIANANDAN, D. Endothelium Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. **Blood vessels**. 28: 52-61, 1991.

GIBBS, BB, et al. The association of arterial shear and flow-mediated dilation in diabetes. **Vasc Med** 16:267-274, 2011.

GORDON, CC; CHUMLEA, WC; ROCHE, AF. **Stature, recumbent length and weight**. In: LOHMAN, TG, ROCHE, AF, MARTORELL, R (eds.) Anthropometric standardization reference manual. Champaign: Human Kinetics Books, 1988.

GRASSI, B; QUARESIMA, V. Near-infrared spectroscopy and skeletal muscle oxidative function *in vivo* in health and disease: a review from an exercise physiology perspective. **J Biomed Opt** 21:091313, 2016.

GRECO, M, et al. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun** 163:1428–1434, 1989.

GREEN, DJ; SWART, A; EXTERKATE, A, et al. Impact of age, sex and exercise on brachial and popliteal artery remodelling in humans. **Atherosclerosis** 201:525-530, 2010.

HAERTEL, A, et al. Prognostic value of tissue oxygen saturation using a vascular occlusion test in patients in the early phase of multiorgan dysfunction syndrome. **Shock** 2018 [ahead of print]

HAMAOKA, T, et al. The use of muscle near-infrared spectroscopy in sport, health and medical sciences: recent developments. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci** 369:4591-4604, 2011.

HUANG, YY, et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response** 7:358–383, 2009.

IPOVSKY, A, et al. Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells. **Lasers Med Sci** 28:1113-1117, 2012.

JONES, B, DAT, M, COOPER, CE. Underwater near-infrared spectroscopy measurements of muscle oxygenation: laboratory validation and preliminary observations in swimmers and triathletes. **J Biomed Opt** 19:127002, 2014.

KARU, TI. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol b Biol** 49:1–17, 1999.

_____. Is it time to consider photobiomodulation as a drug equivalent? **Photomed Laser Surg** 31:189-191, 2013.

_____. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. **Photomed Laser Surg** 29:159-160, 2010.

KARU, TI; KOLYAKOV, SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed Laser Surg** 23:355–361, 2005.

KIM, WS, CALDERHEAD, RG. Is light emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? **Laser Ther** 20:205-215, 2011.

KRAGELJ, R, et al. Parameters of postocclusive reactive hyperemia measured by near infrared spectroscopy in patients with peripheral vascular disease and in healthy volunteers. **Ann Biomed Eng** 29:311-320, 2001.

LANGHAM, MC; WEHRLI, FW. Simultaneous mapping of temporally-resolved blood flow velocity and oxygenation in femoral artery and vein during reactive hyperemia. **J Cardiovasc Magn Reson** 13:66, 2011.

LANZAFAME, RJ, et al. Reciprocity of exposure time and irradiance on energy density during photoradiation on wound healing in a murine pressure ulcer model. **Lasers Surg Med** 39:534–42, 2007.

LARKIN, KA, et al. Limb blood flow after class 4 laser therapy. **J Athl Train** 47:178-183, 2012.

LIEBERT, A, et al. A role for photobiomodulation in the prevention of myocardial ischemic reperfusion injury: a systematic review and potential molecular mechanisms. **Sci Rep** 7:42386, 2017.

LINDGARD, A., et al. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. **Lasers Med Sci** 22:30-36, 2006.

LOHR, NL, et al. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: potential role in cardioprotection. **J Mol Cell Cardiol**. 47:256–263, 2009.

LUBART, R, et al. Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. **Photomed Laser Surg** 24:179–85, 2006.

MAEGAWA, Y, et al. Effect of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. **Lasers Surg Med** 27:427-437, 2000.

MANDEL, A; HAMBLIN, MR. A renaissance in low-level laser (light) therapy – LLLT. **Photon Lasers Med** 4:231-243, 2012.

MATSUO, H, et al. Heat and photolytic nitric oxide are essential factors for light-induced vascular tension changes. **Lasers Med Sci** 15:181-187, 2000.

McLAY, A, et al. Vascular responsiveness determined by near-infrared spectroscopy measures of oxygen saturation. **Exp Physiol** 102:34-40, 2016a.

McLAY, KM, et al. Vascular responsiveness measured by tissue oxygen saturation reperfusion slope is sensitive to different occlusion durations and training status. **Exp Physiol** 101: 1309-1318, 2016b.

McLAY, A, et al. Repeatability of vascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy. **Phys Rep** 4:e12772, 2016c.

MITCHELL, UH; MACK, GL. Low-level laser treatment with near-infrared light increases venous nitric oxide levels acutely. **Am J Phys Med Rehab** 92:151-156, 2013.

NAGHAVI M, et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet** 390:1151-1210, 2017.

NAMPO, FK, et al. Low-level phototherapy to improve exercise capacity and muscle performance: a systematic review and meta-analysis. **Lasers Med Sci** 31:1957-1970, 2016.

ORON, U, et al. Low-energy laser irradiation reduces formation of scar tissue after myocardial infarction in rats and dogs. **Circulation** 103:296–301, 2001.

ORSHAL, JM, KHALIL, RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 286:R233-R249, 2004.

PICKERING, TG, et al. Blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. **Circulation** 111:697-716, 2005.

PLASS, C, et al. Light-induced vasodilation of coronary arteries and its possible clinical implication. **Ann Thorac Surg** 93:1181-1186, 2012.

POORE, S, et al. Evidence of vascular endothelial dysfunction in young patients with cystic fibrosis. **Chest** 143:939-945, 2013.

RAKOBOWCHUK M, et al. Sprint interval and traditional endurance training induce similar improvements in peripheral arterial stiffness and flow-mediated dilation in healthy humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 295:R236-R242, 2008.

ROHRINGER, S, et al. The impact of wavelengths of LED light-therapy on endothelial cells. **Sci Rep**. 7:10700, 2017.

ROSENBERRY, R, et al. Age-related microvascular dysfunction: novel insight from near-infrared spectroscopy. **Exp Physiol** 103:190-200, 2018.

SAMOILOVA, KA, et al. Role of nitric oxide in the visible light-induced rapid increase of human skin microcirculation at the local and systemic levels: II. healthy volunteers blood flow after class 4 laser therapy. **Photomed Laser Surg** 26:443-449, 2018.

SCHULZ, H. Uber Hefegiste. **Pflügers Archiv Gesamte Physiologie** 42:517–541, 1888.

SOARES, RN; MURIAS, JM. Near-infrared spectroscopy assessment of microvasculature detects difference in lower limb vascular responsiveness in obese compared to lean individuals. **Microvasc Res** 118:31-35, 2018.

SOARES, RN; REIMER, RA; MURIAS, JM. Changes in vascular responsiveness during a hyperglycemia challenge measured by near-infrared spectroscopy vascular occlusion test. **Microvasc Res** 111:67-71, 2017.

SOUTHERN, WM, et al. Reduced skeletal muscle oxidative capacity and impaired training adaptation in heart failure. **Physiol Rep** 3:12353, 2015.

THIJSSSEN, DHJ, et al. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 300:H2-H12, 2011.

THOMAS, JR; NELSON, JK. **Research methods in physical activity**. Champaign: Human Kinetics Books, 2001.

TUTTLE, JL. Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 281:H1380-H1389, 2011.

VAN BEEKVELT, MC, et al. Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O₂ consumption and blood flow in skeletal muscle. **J Appl Physiol** 90:511-519, 2001.

WILLINGHAM, TB; MCCULLY, KK. *In vivo* assessment of mitochondrial dysfunction in clinical populations using near-infrared spectroscopy. **Front Physiol** 8:689, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Defining the problem of overweight and obesity**. Geneva: Technical Report Series, 2000.

ZHANG, R, et al. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. **J Mol Cell Cardiol** 46:4-14, 2009.

ZHANG, X, et al. Endothelium-dependent and -independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. **Atherosclerosis** 149:19-24, 2000.