
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE
PARÂMETROS DE ATIVIDADE MUSCULAR, TEMPO ATÉ A EXAUSTÃO EM ESFORÇO
RETANGULAR NO DOMÍNIO SEVERO EM CICLO ERGÔMETRO E NOS ASPECTOS
CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA FADIGA MUSCULAR**

YAGO MEDEIROS DUTRA

Março – 2019

Bauru - SP



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE
PARÂMETROS DE ATIVIDADE MUSCULAR, TEMPO ATÉ A EXAUSTÃO EM ESFORÇO
RETANGULAR NO DOMÍNIO SEVERO EM CICLO ERGÔMETRO E NOS ASPECTOS
CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA FADIGA MUSCULAR**

YAGO MEDEIROS DUTRA

PROF. DR. ALESSANDRO MOURA ZAGATTO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências do Campus de Bauru, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Motricidade.

Março – 2019

Bauru - SP

Dutra, Yago.

Avaliação dos efeitos da terapia de fotobiomodulação sobre parâmetros de atividade muscular, tempo até a exaustão em esforço retangular no domínio severo em ciclo ergômetro e nos aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular / Yago Medeiros Dutra, 2019

123 f. : il.

Orientador: Alessandro Moura Zagatto

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2019

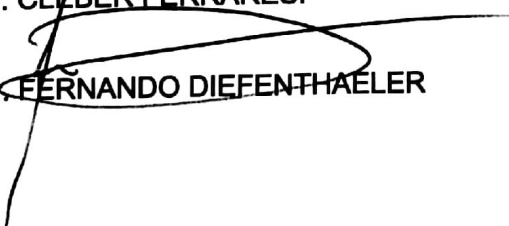
1. Ciências do esporte. 2. Terapia de luz com baixa intensidade. 3. Desempenho. 4. Fadiga muscular. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE YAGO MEDEIROS DUTRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 17 dias do mês de abril do ano de 2019, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro do Prédio da Pós-graduação da Faculdade de Ciências, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ALESSANDRO MOURA ZAGATTO - Orientador(a) do(a) Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências de Bauru - SP, Prof. Dr. CLEBER FERRARESI do(a) Departamento de Engenharia Biomédica / Universidade Brasil, Prof. Dr. FERNANDO DIEFENTHAELER do(a) Departamento de Educação Física - Centro de Desportos / Universidade Federal de Santa Catarina, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de YAGO MEDEIROS DUTRA, intitulada **Avaliação dos efeitos da terapia de fotobiomodulação sobre parâmetros de atividade muscular, tempo até a exaustão em esforço retangular no domínio severo em ciclo ergômetro e nos aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular..** Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. ALESSANDRO MOURA ZAGATTO


Prof. Dr. CLEBER FERRARESI


Prof. Dr. FERNANDO DIEFENTHAELER

**A presente dissertação de mestrado foi realizada com o apoio financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**



Processo 2017/11255-0

AGRADECIMENTOS

Apesar do presente trabalho constituir-se de uma obra científica, não poderia deixar de começar agradecendo primeiramente à Deus, seja qual for sua forma. Vários são os bons acontecimentos que ocorreram e vem ocorrendo na minha vida até o presente momento, alguns bons demais para simplesmente atribuí-los à sorte ou acaso.

Em seguida, gostaria de ressaltar a fundamental contribuição da minha família, que apesar das dificuldades, sempre acreditaram, me incentivaram e fizeram o possível para que esse objetivo pudesse vir a se concretizar. Pai, Mãe, Irmã, essa dissertação é tão minha quanto de vocês.

Agradeço também a todos os familiares e amigos, conquistados ao longo da vida, com os quais tive o privilégio de dividir inúmeros momentos. Vocês também são parte fundamental para fazer de mim quem sou hoje, pessoalmente e profissionalmente.

Agradeço aos amigos e professores, que, ainda durante a minha graduação, ao saberem dos meus planos de pleitear uma vaga para o mestrado, não mediram palavras para me incentivar e acreditar que realmente seria possível alcançar esse objetivo.

De maneira específica aos últimos quase três anos, agradeço primeiramente ao meu orientador, pela confiança depositada em mim e por tornar possível toda essa experiência pessoal e profissional única e marcante.

Posteriormente, aos amigos, que vieram das mais diversas formas, desde os que dividiram o mesmo teto aos que dividiram os erros nas coletas de dados, os momentos de desespero, os churrascos e as festas open bar. Não é exagero dizer que sem a contribuição única de cada um de vocês, concluir toda essa odisseia seria quase impossível.

Gostaria de agradecer também, aos voluntários envolvidos na presente pesquisa, que, por dedicarem horas dos seus dias na realização de inúmeros procedimentos, nem sempre confortáveis, tornaram possível obter as descobertas posteriormente aqui relatadas.

Por fim, agradeço aos funcionários da UNESP-Bauru, que das mais várias formas, contribuíram para tornar menos conturbada a intensa rotina de trabalho vivenciada nesse período.

À todos vocês, sou imensamente grato por contribuírem para a minha trajetória até aqui.

RESUMO

O objetivo geral da presente dissertação foi investigar os efeitos de duas doses de TFBM sobre o tempo até a exaustão em esforço retangular no domínio severo em ciclo ergômetro, explorando durante o exercício as respostas fisiológicas decorrentes da atividade muscular (ex. metabólicas, gasométricas, eletromiográficas e respiratórias), assim como, os aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular após esforço. Para isso, dois estudos foram realizados, estudo 1 e 2. Participaram do projeto 27 voluntários (14 participantes no estudo 1 e 13 no estudo 2). O estudo 1 teve como objetivo investigar os efeitos de duas doses de TFBM sobre aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular após esforço de ciclismo em carga constante no domínio severo ($\Delta 60\%$) com duração equalizada, analisando também, as respostas neuromusculares durante o esforço. Os sujeitos realizaram 5 esforços em dias distintos, um na forma de familiarização e um na forma controle, ambos até à exaustão e três, com duração idêntica à atingida na condição controle, precedidos por uma das três intervenções utilizadas no presente estudo: TFBM na dose de 260 J, TFBM na dose de 130 J e placebo (tratamento com o aparelho desligado), de maneira randomizada, cruzada e com duplo-cegamento. Durante o esforço as repostas eletromiográficas de músculos do membro inferior dominante foram avaliadas e antes e após esforço, contrações voluntárias máximas associada à eletroestimulação periférica do nervo femoral foram efetuadas, objetivando investigar aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular. Já no estudo 2, os voluntários realizaram em dias distintos 5 esforços, todos até à exaustão, os 2 primeiros na forma de familiarização, os últimos 3 precedidos por uma das três modalidades de intervenção (TFBM na dose de 260 J, ou 130 J, ou placebo [aparelho desligado]; de forma randomizada, cruzada e com duplo-cegamento). Ainda, durante os três últimos esforços, houveram o monitoramento das respostas eletromiográficas de músculos do membro inferior dominante, respostas capilares gasométricas, das concentrações de lactato sanguíneo e da troca gasosa respiratória, com as coletas e/ou análises sendo realizadas em janelas de tempo idênticas para as 3 condições, determinadas com base no menor tempo atingido entre os três últimos esforços. Diante do resultados obtidos nos estudos 1 e 2, de modo geral, a TFBM nos parâmetros utilizados teve uma ligeira positiva influência sobre aspectos neuromusculares durante a realização do esforço (significante) e sobre a fadiga muscular após esforço (não significante). No entanto, não observou-se efeito da TFBM no tempo

até exaustão no tipo de esforço proposto, bem como mudanças nas respostas metabólicas, gasométricas e respiratórias durante exercício.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia de fotobiomodulação; Fadiga muscular; Desempenho físico.

ABSTRACT

The general objective of this dissertation was to investigate the effects of two doses of photobiomodulation (PBM) on time to exhaustion in a constant load cycling effort at severe domain ($\Delta 60\%$, [CLE₆₀]), exploring during the exercise the physiological responses resulting from muscular activity (ie, metabolic, gasometric, electromyographic and respiratory), as well as the central and peripheral aspects of muscle fatigue after effort. For this, two studies were carried out, study 1 and 2. Twenty-seven volunteers (14 participants in study 1 and 13 in study 2) participated in the study. Study 1 aimed to investigate the effects of two doses of PBM on central and peripheral aspects after CLE₆₀ with equalized duration (ie, isotime) as well as the neuromuscular responses during the exercise. The subjects performed 5 efforts on different days, one in the form of familiarization and one in the control form, both until exhaustion. The last three efforts were performed with the same duration as that reached in the control condition, preceded by one of the three interventions used in the present study: PBM at the dose of 260 J, PBM at 130 J and placebo (PBM with the device switched off, dose of 0 J). During the last 4 exercises, the electromyographic responses of muscles of the dominant lower limb were evaluated and before and after the last three efforts, neuromuscular evaluations associated with peripheral electrical stimulation of the femoral nerve were performed, aiming to investigate central and peripheral aspects of muscle fatigue. In study 2, the volunteers performed on different days, 5 CLE₆₀ to exhaustion, the first 2 in the form of familiarization, the last 3 preceded by one of the three modalities of intervention (PBM at the dose of 260 J, or 130 J, or placebo in a randomized, double-blinding cross-over design). Also, during the last three efforts, the electromyographic responses of dominant lower limb muscles, gasometric capillary responses, blood lactate concentrations and respiratory gas exchange were monitored, with the collections and/or analyzes being performed in identical time windows for the 3 conditions, determined on the basis of the shortest time achieved between the last three efforts. Considering the results obtained in studies 1 and 2, in general, the PBM in the parameters used had a slight positive influence on neuromuscular aspects during effort (significant) and on muscle fatigue after effort (non significant). However, there was no effect of PBM in the time until exhaustion in the type of effort proposed, as well as changes in metabolic, gasometric and respiratory responses during exercise.

Keywords: Photobiomodulation therapy; Muscle fatigue; Exercise

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%AV	Percentual de ativação muscular voluntária
$\dot{V}CO_2$	Volume de dióxido de carbono expirado
$\dot{V}O_2$	Consumo de oxigênio
$\dot{V}O_{2max}$	Máximo consumo de oxigênio
1RM	Uma repetição máxima
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BF	Bíceps femoral
CCO	Citocromo c oxidase
CMEP	<i>Cortical motor-evoked potential</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CVIM	Contração voluntária isométrica máxima
CVM	Contração voluntária máxima
EMG	Eletromiografia de superfície
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FM	Frequência média
FMd	Frequência mediana
FMdmax	Máxima frequência mediana
FMmax	Máxima frequência média
GM	Glúteo máximo
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6

iLV1	Intensidade correspondente ao primeiro limiar ventilatório
IMC	Índice de massa corporal
IMC	Índice de massa corporal
iPCR	Intensidade correspondente ao ponto de compensação respiratória
iPCR	Intensidade correspondente ao ponto de compensação respiratória
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	<i>Light emitting diode</i>
MEP	<i>Motor-evoked potential</i>
NO	Óxido nítrico
PAE	Potencial de ação elétrico
PCr	Fosfocreatina
PCR	Ponto de compensação respiratória
PGE-2	Prostaglandina-E 2
Pi	Fosfato inorgânico
PNS	<i>Peripheral nerve stimulation</i>
RF	Reto femoral
RMS	<i>Root mean square</i>
RMSmax	Máxima <i>root mean square</i>
SENIAM	<i>Surface electromyography for the non-invasive assessment of muscles</i>
SWC	<i>Smallest worthwhile change</i>
TC	<i>Twitch control</i>
TFBM	Terapia de fotobiomodulação
Tinc	Teste incremental
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TS	<i>Twitch superimposed</i>
VE	Volume de ar expirado
VL	Vasto lateral

$\dot{V}O_{2\max}$

Intensidade correspondente ao máximo consumo de oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2. REVISÃO DE LITERATURA
 - 2.1. Fadiga muscular
 - 2.1.1. Definição e mecanismos associados à fadiga muscular
 - 2.1.2. Métodos de investigação da fadiga muscular
 - 2.1.3. Fadiga muscular e sua influência no desempenho físico
 - 2.2. Terapia de fotobiomodulação
 - 2.2.1. Abordagem histórica
 - 2.2.2. Parâmetros de operacionalização
 - 2.2.3. Mecanismos de ação
 - 2.2.4. Terapia de fotobiomodulação e suas influências na fadiga muscular e desempenho físico
3. OBJETIVOS
 - 3.1. Objetivos gerais
 - 3.2. Objetivos específicos
4. HIPÓTESE
5. MATERIAIS E MÉTODOS
 - 5.1. ARTIGO 1
 - 5.2. ARTIGO 2
6. CONCLUSÕES
7. REFERÊNCIAS
8. ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

Durante a realização de uma atividade física, a fadiga muscular pode ser definida como uma redução da capacidade do sistema neuromuscular em produzir um nível desejado de força e/ou potência (1,2). Esse fenômeno tem causa multifatorial, é diretamente influenciado pelas características da atividade que está sendo executada (tipo de contração, velocidade e duração) e decorre de modificações na atividade do sistema nervoso central, acarretando em falhas da ativação muscular voluntária e/ou de alterações periféricas, que limitam fatores como transmissão e/ou propagação do potencial de ação, assim como, capacidade contrátil do tecido muscular (2–4).

Em relação aos aspectos periféricos da fadiga muscular, vários podem ser os seus fatores causais e dentre eles estão a diminuição dos níveis de ATP celular (4), aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) (5) e acúmulo de metabólitos como H^+ e fosfato inorgânico (P_i) (4,6). Por sua vez, os aspectos centrais da fadiga muscular envolvem, frequentemente, a diminuição reflexa atividade do córtex motor, devido estímulos aferentes desencadeados pelas alterações bioquímicas teciduais dos principais músculos em atividade (7), músculos sinergistas e respiratórios (8–10), assim como, por sensações psicossomáticas como dor/desconforto e percepção subjetiva de esforço (9).

Além desses, o aumento da produção do neurotransmissor serotonina na região cortical (11) e o aumento dos níveis de amônia nos espaços extra e intracelulares neuronais (12) são ,também, apontados como fatores causais para o declínio da atividade do córtex motor e, portanto, causadores do aspecto central da fadiga muscular.

No cenário esportivo, a fadiga muscular é vista como um dos elementos limitantes do desempenho de um atleta, uma vez que a mesma, prejudica diferentes aspectos necessários para o êxito na realização do exercício, tais quais, manutenção do nível de força e/ou potência requeridos, velocidade e técnica de execução da atividade (13,14). Além disso, sensações psicossomáticas provenientes desse fenômeno (ex. dor/desconforto muscular e aumento da percepção de esforço) também são apontadas como fatores que podem influenciar de forma negativa o desempenho físico (9,10).

Desse modo, treinadores e atletas buscam constantemente por meios de retardar os efeitos da fadiga muscular durante a manutenção de esforços e, conseqüentemente, promover a melhoria do desempenho físico. Dentre essas estratégias, a terapia de fotobiomodulação (TFBM)(15) vem sendo sugerida como um recurso promissor (16–18).

Definida como a irradiação não térmica de fótons através de dispositivos de amplificação de luz por emissão estimulada de radiação (LASER) ou diodos emissores de luz (LED), a TFBM vem sendo, nas últimas décadas, utilizada no ambiente clínico objetivando acelerar a reparação tecidual, promover analgesia e atenuar sinais e sintomas do processo inflamatório (19,20), no entanto, devido interações com fenômenos fisiológicos específicos, esse recurso passou recentemente, a também ser atrativo para a comunidade esportiva, como um potencial recurso ergogênico para o desempenho físico (21–27).

Dentre os efeitos mais conhecidos da TFBM nos organismos vivos está a sua capacidade em estimular a enzima Citocromo C oxidase presente na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, resultando em um aumento da ressíntese de adenosina trifosfato (ATP) localmente através do metabolismo oxidativo (28,29). Infere-se que essa maior disponibilidade de ATP perduraria o funcionamento adequado das bombas iônicas presentes no sarcolema e retículo sarcoplasmático, mantendo por mais tempo a capacidade de despolarização da fibra muscular e a satisfatória disponibilidade do íon Ca^{+} para as miofibrilas (30), ambos os fenômenos, essenciais para o processo de contração muscular.

Além desses fatores, a atenuação dos efeitos do estresse oxidativo e a melhora da perfusão tecidual, que acarretaria na melhora do *clearance* de metabólitos como o adenosina monofosfato (AMP), difosfato (ADP) e Pi , são efeitos também atribuídos à TFBM e que podem vir a contribuir para retardar o processo de fadiga muscular e melhorar o desempenho físico (16,28).

Nesse contexto, Leal Junior e colaboradores (2008, 2009a, 2009c, 2010), investigando em uma série de estudos com atletas de voleibol, a eficácia da TFBM no músculo bíceps braquial em aumentar o tempo até à exaustão e o número de repetições de flexo-extensão do cotovelo com carga a 75% de uma repetição máxima (1RM), aplicada aproximadamente 10 minutos antes da execução do exercício, observaram que esse recurso acarretou aumentos no tempo até a exaustão e no número de repetições nesse

esforço, que variaram de 8,1-39% e 11,5-29,4%, respectivamente, quando comparado à condição placebo.

Entretanto, apesar desses indícios sobre a eficácia da TFBM como recurso ergogênico em esforços que envolvem musculaturas isoladas, alguns autores refutam esses achados (32,33), constatando-se ainda mais divergências, quando esse método foi investigado no desempenho de exercícios com gestos motores de maior complexidade (ex. corrida, ciclismo) (24–27,34). Marchi et al., (2012) e Miranda et al., (2016), utilizando a TFBM em todo o membro inferior imediatamente antes à realização de teste incremental, constataram, respectivamente, um aumento de 2% e 5,1% no tempo até à exaustão, quando comparado à condição placebo. Ainda, no ciclismo, Lanferdini et al., (2017) também evidenciaram que diferentes doses de TFBM, aplicadas previamente ao esforço, na região anterior da coxa, foram efetivas em aumentar o tempo até exaustão na intensidade equivalente ao consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_{2max}$) entre ~8-14 % em comparação à intervenção placebo.

Entretanto, Leal Junior et al., (2009b, 2009d), ao utilizar a TFBM no quadríceps antes do teste de *Wingate*, não observaram alterações no trabalho realizado, potência pico e potência média do teste quando comparado à intervenção placebo. Do mesmo modo, Malta et al.,(2016) utilizando a TFBM no membro inferior (reto femoral, isquiotibiais e gastrocnêmio), não observaram melhora no tempo até à exaustão durante corrida em esteira em intensidade supramáxima (15% acima da $\dot{V}O_{2max}$) quando comparado à condição placebo, assim como melhora na capacidade anaeróbia.

Apesar dos recentes esforços em padronizar o uso da TFBM, a ampla divergência nas características dos protocolos de intervenção (ex. dose utilizada, área de irradiação), assim como a grade diversidade de aparelhos empregados na realização dessa terapia (ex. aparelhos com exclusiva emissão de fótons, aparelhos com emissão de fótons associada à geração campos magnéticos, são aspectos comumente apontados como determinantes para a ausência de consenso sobre a efetividade ou não desse recurso nesse cenário de utilização (17,36). Além disso, particularidades nos procedimentos investigativos como a característica dos esforços realizados (ex. teste de *Wingate* e corrida em intensidade supramáxima) e dos voluntários recrutados (ex. indivíduos não treinados para executar esforços máximos na qual não são familiarizados) são também usualmente apontados como aspectos externos à TFBM que podem influenciar o desempenho físico dos sujeitos

e, de certa forma, distorcer conclusões acerca dos efeitos desse recurso como ergogênico do desempenho físico (16,27).

Dessa forma, verifica-se que a real eficácia da TFBM em incrementar o desempenho físico, seja em gestos motores monoarticulares ou em esforços de maior complexidade, permanece ainda bastante questionada. Concomitantemente, observa-se também, a ausência de inferências científicas mais robustas que elucidem os impactos desse recurso sobre a atividade do sistema muscular durante exercício, sobre a dinâmica do surgimento da fadiga e sobre aspectos centrais e periféricos desse fenômeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fadiga muscular

2.1.1. Definição e mecanismos relacionados

Uma das características mais notáveis do sistema neuromuscular é a sua capacidade adaptativa mediante à alterações na sua demanda de uso (2,37). Dessa forma, modificações em sua morfologia e/ou funcionamento podem ser desencadeadas pelos mais diferentes tipos de estímulos, sejam eles crônicos, como o treinamento, a imobilização e o envelhecimento (38), ou mesmo agudos, como a sustentação de uma atividade física (13). De forma aguda, uma das adaptações mais relevantes e estudadas nesse sistema ao longo dos anos é o processo de fadiga muscular (1,3,39,40).

Nesse contexto, fadiga muscular é uma condição do sistema neuromuscular ocasionada por diferentes fatores provenientes da execução de uma atividade física, acarretando na incapacidade temporária de gerar e/ou sustentar um nível desejado de força e/ou potência (2,41). Sendo a atividade muscular voluntária decorrente de uma sucessão de eventos fisiológicos que ocorrem tanto nos seus segmentos centrais (córtex e medula) como nas regiões periféricas (nervos motores e músculo), falhas no funcionamento em um ou mais desses componentes, são responsáveis pelo surgimento da fadiga muscular (3,4).

Dentre os fatores que acarretam a falha no funcionamento do componente periférico do sistema neuromuscular, uma das inferências mais clássicas reportadas na literatura é a de depleção de substratos para a ressíntese de adenosina trifosfato (4,42),

molécula cuja quebra provê energia para todas as atividades biológicas, inclusive as envolvidas no trabalho muscular (43).

Em esforços máximos e de curta duração (aproximadamente 15 s), sabe-se que o ATP é ressintetizado predominantemente através da quebra de moléculas de fosfocreatina (PCr) (37), e em esforços mais prolongados (aproximadamente >15 s), a glicose proveniente dos estoques de glicogênio no músculo, e, posteriormente, do sangue (advinda das reservas de glicogênio hepático e alimentação), passam a ser a principal fonte de substrato para a ressíntese dessa molécula energética (37).

Dessa forma, tem sido demonstrado que o declínio nos níveis dessas duas moléculas no ambiente celular, acarreta uma diminuição da capacidade de gerar força/potência, observando-se que a redução das concentrações de PCr apresenta-se mais relacionada ao prejuízo da função muscular em atividades de alta intensidade com curta duração (<30 s) (44–46) e a diminuição dos níveis de glicose, à esforços mais prolongados (>30 s) (47–49).

Entretanto, sabendo-se que as concentrações de ATP celular, após a falha da capacidade contrátil do músculo, não diminuem muito mais do que 60% em relação aos valores prévios ao exercício (50–53), outros fatores, externos às condições energéticas da fibra muscular, estão também estritamente relacionados à falha da sua capacidade contrátil. Dentre esses estão os metabólitos, moléculas provenientes da atividade das vias de produção de energia, cujas concentrações aumentam paralelamente ao aumento da atividade dessas vias e que, mesmo com níveis energéticos e estímulo elétrico adequados, prejudicam os eventos intracelulares necessários para a contração tecidual (3,4).

A quebra dos compostos de PCr, por exemplo, acarreta no aumento da concentração de moléculas de fosfato inorgânico (Pi) no interior da fibra muscular (37). Tem sido demonstrado que níveis elevados de Pi, apesar de inicialmente elevarem a liberação de íons Ca^{++} pelo retículo sarcoplasmático (54), acarretam posteriormente a diminuição dos níveis de íon Ca^{++} livres nessa organela (55), assim como, a sua liberação para o citosol (56). Além disso, também tem sido relatado que o Pi reduz a sensibilidade do miofilamento de troponina aos íons Ca^{++} (57) e inibe o surgimento de fortes interações entre os miofilamentos de actina e miosina (pontes cruzadas) (58). Em conjunto, todos esses fatores culminam no prejuízo da capacidade contrátil da fibra muscular (4).

Por sua vez, a degradação de glicose, principalmente quando realizada através de vias não mitocondriais, envolvem reações que acarretam no acúmulo de moléculas de lactato e de íons H^+ (37). Devido a frequente e curta relação temporal com o declínio na produção de força/potência, o acúmulo desses dois metabólitos foi por muito tempo considerado como o principal causador da fadiga muscular (42). Entretanto, com base em estudos realizados acerca desse fenômeno, essa premissa tem sido bastante refutada (4). Com relação ao lactato, em específico, tem sido demonstrado que o aumento dos seus níveis dentro das células musculares causa pouquíssimo, ou mesmo, nenhum dano ao funcionamento do sistema neuromuscular (4,59–61).

Em relação à contribuição dos íons H^+ e a consequente diminuição do pH celular, apesar de ter sido por muito tempo apontado como um fator que prejudicaria o processo contrátil da fibra devido, dentre outros aspectos, limitar o trabalho enzimático presente nos processos de quebra da glicose (62), inibir a liberação dos íons Ca^{++} pelo retículo sarcoplasmático, assim como, diminuir a sensibilidade dos miofilamentos a esses íons (63–65), estudos realizados em músculos intactos (66) e fibras isoladas (67,68), vem demonstrando que em temperaturas próximas as fisiológicas (ex. $>30^{\circ}C$), grandes níveis de íons H^+ , somente, parecem ocasionar pouco prejuízo ao processo contrátil.

Todavia, apesar de refutados os impactos negativos que o aumento das concentrações de íons H^+ tem de forma isolada sobre a função contrátil do tecido muscular, a diminuição do pH por ele acarretada, é ainda apontado por alguns pesquisadores como relevante para o surgimento da fadiga muscular (69), sendo observado em ensaios em vitro, que a diminuição do pH pode contribuir para acentuar os efeitos deletérios à função muscular ocasionados pela molécula de Pi (70). Além disso, devido os estímulos sensoriais que promove, a diminuição do pH tecidual parece também acarretar em prejuízos à função muscular por meio da geração de respostas reflexas à nível medular e cortical, que diminuem, respectivamente, a taxa de despolarização dos neurônios motores e o nível de ativação muscular voluntária. (1,3). Tal aspecto será melhor discutido posteriormente no presente texto.

De forma similar, outros metabólitos relacionados ao surgimento do fenômeno de fadiga são as espécies reativas de oxigênio (EROs) (4,71), moléculas provenientes da oxidação de glicose e lipídios pelas mitocôndrias das células musculares e que tem sua

produção elevada em esforços cuja via aeróbia de produção de energia figura como predominante (ex. duração >1 min)(37,72).

Em específico aos processos envolvidos na contração do tecido muscular, estudos vem reportando que a elevação dos níveis de EROs durante um esforço físico prejudicam a liberação de íons Ca^{++} pelo retículo sarcoplasmático (73) e a sensibilidade dos miofilamentos contráteis a esses íons (74), assim como, reduzem a eficiência das interações miofibrilares entre actina e miosina (75). Ainda, além desses fatores, as EROs parecem também ocasionar prejuízos à função contrátil do tecido por induzirem vasoconstrição, acometendo o fluxo sanguíneo local (76).

É importante ressaltar que não apenas os processos de ressíntese de ATP (ex. vias metabólicas anaeróbias alática e láctica e via aeróbia), mas também, a própria geração de energia através da sua forma mais essencial, a hidrólise da molécula de ATP, acarreta a geração de metabólitos causadores da falha no processo contrátil da célula (ex. H^+ e P_i , antes citados, assim como, moléculas de AMP e ADP)(4). Dessa forma, corroborando com a premissa postulada por alguns autores de que o estado de fadiga é um mecanismo fisiológico protetivo (2), simultaneamente ao seu trabalho excessivo (ex. aumento da hidrólise de ATP), o sistema neuromuscular parece criar meios indiretos para alertá-lo sobre a iminência do seu limite.

Contudo, outro fator também responsável por afetar a habilidade contrátil do músculo, é a sua inadequada excitação elétrica (4). A excitação elétrica da fibra muscular acarreta a criação de um potencial de ação elétrico (PAE) que, ao percorrer todo o sarcolema celular, atinge invaginações da membrana denominadas túbulos T, estruturas responsáveis por gerar uma rápida e sincrônica liberação de íons Ca^{++} do retículo sarcoplasmático para o citosol celular (77). Desse modo, fatores que venham à prejudicar a excitação elétrica da fibra, acarretam distúrbios à liberação do íon Ca^{++} e consequentes falhas na contração muscular (4,78).

A excitação elétrica da fibra muscular e a consequente geração e propagação do PAE pelo sarcolema são decorrentes de alterações nas concentrações iônicas dos ambientes intra e extracelulares, principalmente o influxo de íons Na^+ e efluxo de íons K^+ celulares, ambos passivos, ocasionados pela abertura de canais transmembrana, cuja ação dependem de estímulos advindos do nervo motor (77). Após a cessação do estímulo, esses canais se fecham e transportadores ativos presentes na membrana, as bombas de Na^+/K^+ ,

executam a movimentação contrária desses íons a fim de atingir as concentrações intra e extracelulares observadas em repouso (77).

A medida que PAEs são constantemente gerados, principalmente em altas frequências, observa-se uma falha da recaptação dos íons K^+ para dentro da célula, com um consequente acúmulo no interstício (79) e diminuição nas concentrações intracelulares (80). Sem a adequada concentração intracelular desses íons, observa-se prejuízos à magnitude e velocidade (81), assim como, à geração de novos PAEs (82), afetando, portanto, a magnitude, velocidade e geração dos eventos fisiológicos por ele desencadeados (4), sendo demonstrado que esses prejuízos no PAE, decorrentes da falha na recaptação dos íons K^+ , estão diretamente relacionados à prejuízos no processo contrátil (83–86).

Apesar dos mecanismos envolvidos na falha da atividade das bombas de Na^+/K^+ não estarem completamente elucidados, a diminuição dos níveis de ATP nas regiões celulares próximos à esses transportadores (87), assim como, o efeito deletério das EROs sobre essas estruturas, (88–90), são os fatores causais mais frequentemente relatados e aceitos na atualidade.

Todavia, além das condições energéticas, nível de metabólitos e excitabilidade tecidual, falhas na chegada do estímulo elétrico à fibra muscular, também acarretam decréscimos na sua capacidade contrátil (4,78). Tem sido demonstrado que o motoneurônio- α , com o decorrer da manutenção de um esforço físico, apresenta em determinado momento, uma diminuição da sua capacidade de despolarização, reduzindo a magnitude e frequência dos disparos elétricos por ele gerados (91,92). Como todos os eventos musculares envolvidos no processo de contração são dependentes da chegada de adequado estímulo elétrico à fibra muscular (77), essas alterações na atividade do motoneurônio- α acarretam diretamente o declínio da produção de força/potência (4).

Dentre os fatores envolvidos no dano à atividade do motoneurônio- α , tem sido observado que estímulos aferentes provenientes dos músculos em atividade acarretam à nível medular, uma inibição reflexa desse neurônio motor (93,94). Esses estímulos são levados até à medula através de pequenas vias nervosas aferentes denominadas grupamento nervoso III e IV, responsivas às condições mecânicas, bioquímicas, e térmicas dos músculos (95,96).

Elevação na temperatura e nas concentrações extracelulares do íon K^+ (83), diminuição do pH (97), tensionamento e estiramento muscular (98), assim como, hipóxia tecidual (99) e estímulos algícos(100), são alguns dos fatores observados durante a manutenção de um esforço e que aumentam a taxa de disparo desses grupamentos nervosos, diminuindo consequentemente, de forma reflexa, o nível de atividade do neurônio motor (101) e a capacidade de gerar força/potência.

Além da condução do estímulo elétrico da medula ao músculo, falhas na condução desse estímulo pela medula, assim como, na sua própria geração pelo córtex motor, também são observadas no estado de fadiga muscular (3,102). Dentre os principais fatores responsáveis por esses acometimentos, do mesmo modo, está a ativação dos grupamentos nervosos aferentes III e IV(1,103), com estímulos advindos dos músculos agonistas dos movimentos realizados (7), músculos respiratórios(8) e músculos sinergistas aos gestos motores (104). Sensações psicossomáticas, tal qual dor/desconforto e aumento da percepção subjetiva de esforço (104), parecem, do mesmo modo, inibir a atividade do córtex motor e, consequentemente, a geração voluntária de força/potência.

Ainda, sugere-se que a ativação muscular voluntária possa ser prejudicada pela elevação nas concentrações cerebrais de substâncias como a amônia (12,105), tóxica à células neuronais (12,106), assim como, do neurotransmissor serotonina (107,108), responsável por ativar áreas corticais que levam à inibição da atividade motora (109).

2.1.2. Métodos de investigação da fadiga muscular

Uma vez que o conceito de fadiga muscular é categórico, declínio na capacidade de gerar voluntariamente um desejado nível de força e/ou potência (2,110), uma das maneiras mais clássicas e objetivas de evidenciar esse fenômeno é comparando os valores de força gerados por um sujeito durante a manutenção de contrações voluntárias máximas (CVM), sejam elas dinâmicas ou isométricas, antes e após a execução de um esforço até à exaustão (111–114).

Outra alternativa também bastante utilizada para demonstrar a existência da fadiga muscular são os testes de potência antes e após esforços físicos exaustivos (114–117). Assim como as grandezas força pico e média, proveniente de testes com CVMs, a potência pico, potência média e trabalho total gerados, também declinam após instaurada a fadiga muscular (118,119). Além disso, uma vez que contrações concêntricas

demandam maior gasto energético em comparação às contrações isométricas (120), os testes de potência muscular podem caracterizar-se como alternativas mais sensíveis para detectar a presença da fadiga muscular (114), viabilizando também, uma melhor inferência sobre as influências que esse fenômeno acarreta no cenário prático do movimento humano (121).

Entretanto, sabendo-se que esse fenômeno consiste de alterações fisiológicas dinâmicas que surgem de forma gradual após o início e sustentação de um esforço físico (2), a pontual constatação no declínio de força/potência voluntários, obtida através da comparação dos resultados de testes prévios e após esforços até à exaustão, passa a ser um método limitado de investigação da fadiga muscular. (114,121).

Diferente da inalterável condição de fadiga após um exercício verdadeiramente exaustivo (2), a cinética dos acontecimentos que contribuem para o seu surgimento, assim como, os fatores causais mais relevantes, podem variar de acordo com diferentes aspectos envolvidos na execução do esforço (ex. tipo de contração realizada, intensidade e duração do exercício, temperatura ambiente)(3,41). Desse modo, não apenas constatar a presença da fadiga muscular, mas também, acompanhar o seu surgimento durante a prática de um exercício, promove informações adicionais que ampliam a compreensão desse fenômeno e possibilitam analisar como diferentes condições (ex. treinamento, envelhecimento, doenças) podem influenciá-lo (41).

Monitorar a capacidade de geração de força por um sujeito no decorrer da sustentação de um exercício, através da execução de CVMs durante breves pausas no esforço, ou, monitorar as oscilações nos níveis de potência atingidos ao longo de faixas temporais durante um exercício, são alternativas diretas comumente empregadas para promover uma compreensão mais detalhada do surgimento da fadiga muscular durante um esforço, (114). Entretanto, sabendo-se que a geração de força/potência representa o resultado final do conjunto de eventos que envolvem a ativação muscular voluntária, investigar possíveis sítios etiológicos e mecanismos que levam à sua instauração, carece de abordagens investigativas ainda mais minuciosas (3,4).

Nesse contexto, um dos procedimentos indiretos mais utilizados que auxiliam na compreensão mais detalhada do nível de funcionamento do sistema neuromuscular e, conseqüentemente, na dinâmica de surgimento da fadiga muscular é a eletromiografia de superfície (EMG)(114,122). A EMG é um método de registro não invasivo da atividade

elétrica muscular que promove informações como a quantidade de unidades motoras recrutadas (amplitude do sinal) e a taxa de disparo de estímulos elétricos (frequência média ou mediana do sinal) durante uma contração (123,124). Uma vez que essas variáveis estão diretamente relacionadas às condições bioquímicas do ambiente muscular e ao nível de ativação voluntária que o sujeito desempenha, monitorá-las durante a execução de um esforço viabiliza identificar em que momentos o sistema neuromuscular alterou seu funcionamento em detrimento do fenômeno de fadiga (122).

Durante a manutenção de esforços, principalmente de carga constante, tem sido demonstrado que o desenvolvimento gradativo do fenômeno de fadiga consegue ser monitorado através da EMG (122). Sabe-se que na fase inicial de um exercício, a sustentação do mesmo é realizada por apenas uma fração do grupamento muscular envolvido na atividade, porém, à medida que essas unidades motoras primariamente recrutadas vão perdendo a capacidade de manter o mesmo nível de força/potência (ex. entrando em fadiga), o recrutamento adicional de novas unidades motoras ocorre, para proporcionar a manutenção do mesmo nível de intensidade de execução do esforço (124).

Esse ajuste no funcionamento do sistema neuromuscular, acarretado pelo fenômeno da fadiga, é evidenciado através da EMG com um aumento na amplitude do sinal elétrico captado(122,125). De forma paralela, o recrutamento adicional de fibras motoras é também demonstrado por uma elevação dos valores de frequência média/mediana do sinal eletromiográfico, principalmente quando fibras de contração rápida (tipo IIa e IIb) passam ser empregadas para a manutenção do exercício(124). Os índices de frequência média/mediana atingem um máximo platô nos momentos próximos à exaustão e, posteriormente, diminuem, paralelamente aos níveis de força/potência gerados, assim como ocorre durante a sustentação de CVMs (126).

Deste modo, a EMG é considerada uma conveniente ferramenta para viabilizar o acompanhando da dinâmica de surgimento da fadiga durante a execução de um esforço, possibilitando inferências mais detalhadas acerca desse fenômeno e, conseqüentemente, auxiliando na investigação de como ele decorre frente à diferentes condições (ex. intensidade do esforço praticado, nível de treinamento do indivíduo que está executando o esforço, situações patológicas, dentre outras)(41,114,126).

Uma outra alternativa para a investigação do nível de funcionamento do sistema neuromuscular e da dinâmica de surgimento do fenômeno de fadiga durante a execução

de um esforço é o monitoramento de biomarcadores sanguíneos (127). Apesar de demandar procedimentos invasivos, a análise de biomarcadores viabiliza a mensuração da magnitude de diversos processos fisiológicos, incluindo os relacionados à contração muscular, possibilitando, portanto, conhecer o nível de estresse ao qual esse sistema está sendo submetido durante à manutenção de um esforço (128).

Dentre os biomarcadores relacionados ao funcionamento do sistema neuromuscular, um dos mais amplamente utilizados é o lactato (128). Em indivíduos saudáveis, de uma forma geral, elevações nas concentrações de lactato sanguíneas indicam que o metabolismo aeróbio não foi suficiente para atender a taxa momentânea de demanda energética muscular, precisando, portanto, ser suplementado pela via anaeróbia de produção de energia para sustentar o esforço(37). Acredita-se que parte desse lactato produzido seja consumido como substrato no próprio músculo e o restante, extravasa para o sangue, de onde será transportado para outros órgãos como o coração e, principalmente, o fígado (129).

Em intensidades submáximas, devido oscilações abruptas na demanda energética neuromuscular, há ativação da via anaeróbia e consequente produção de lactato, entretanto, a taxa de remoção dessa molécula consegue ser superior à taxa de produção, não havendo elevação nas suas concentrações sanguíneas. Porém, a partir de determinadas intensidades (ex. intensidade do 2º limiar de lactato), a taxa de produção dessa molécula supera a de remoção e um aumento gradativo nas suas concentrações sanguíneas é observado(127,130). Apesar de bem elucidado nos dias atuais que essa molécula tem pouca ou quase nenhuma influência nos mecanismos que geram a fadiga muscular(4), a curta relação temporal entre o seu aumento no sangue e o declínio na capacidade de manter os mesmos níveis de força/potência, indicam que o lactato pode ser considerado um indicador eficaz da dinâmica de trabalho muscular e do processo de fadiga (131).

Em paralelo a produção de lactato, a utilização da via anaeróbia glicolítica para ressíntese de ATP, principalmente atuando de forma predominante para a sustentação do esforço, acarreta na produção de íons H^+ (37), cuja elevação, promove uma consequente diminuição no nível de pH local (aproximadamente 0.5 u.a.). Devido os efeitos deletérios que a acidez prolongada gera à homeostasia celular, esses íons são parcialmente neutralizados por diferentes moléculas presentes na célula, e/ou, transportados ao sangue,

para lá serem tamponados, o que possibilita, portanto, observar uma sequente diminuição nos valores de pH musculares e sanguíneos, respectivamente, à medida que um esforço extenuante se aproxima das fases finais, assim como, instantes após seu término (132,133).

Apesar de ter sido considerado por muito tempo um dos fatores causais mais relevantes da falha contrátil do tecido muscular(42), a relação causa-efeito entre acidez sanguínea/muscular (ex. elevação nos íons H^+) e fadiga é atualmente contestada(4,134). Entretanto, assim como as concentrações sanguíneas de lactato, a recorrente curta relação temporal entre o declínio do pH e a diminuição na capacidade de gerar níveis desejados de força/potência (4), indica que monitorar as oscilações do pH sanguíneo durante um esforço também promove uma compreensão mais detalhada acerca da dinâmica de surgimento do fenômeno de fadiga e iminente falha funcional.

Do mesmo modo, durante a manutenção de esforços em alta intensidade, além da acelerada produção de metabólitos, observa-se também, alterações iônicas nos ambientes intra e extracelulares (135). Dentre essas alterações, a diminuição intracelular da concentração do íon K^+ , com subsequente acúmulo na região extracelular e sangue, é apontada como uma das mais relevantes(4,136,137).

Elevação nas concentrações séricas de íon K^+ durante esforço, inferem um cenário desfavorável à contração muscular, na qual o limiar de excitação da fibra se eleva e passa a demandar uma maior magnitude e/ou frequência de estímulo elétrico, advindo em última instância do neurônio motor, para gerar a despolarização da fibra muscular (4). Alterações na capacidade de despolarização da fibra interferem diretamente na sua capacidade contrátil (77), desse modo, observar o comportamento sérico do íon K^+ , também parece ser uma estratégia eficiente para acompanhar a dinâmica do surgimento do fenômeno de fadiga.

De forma similar, outras biomoléculas também apontadas como capazes de indicar a dinâmica do surgimento da fadiga muscular, principalmente em esforços prolongados (>20min), são as relacionadas ao estresse oxidativo (131). Sabe-se que com o aumento da atividade da via aeróbia de produção de energia durante um esforço, há consequente aumento na produção de EROs (37,138). Uma vez que as EROs geram a oxidação de lipídios, proteínas, e demais estruturas celulares, observa-se durante a sustentação de um esforço, o aumento sanguíneo na concentração dos metabólitos

provenientes dessas reações, assim como, uma diminuição de moléculas responsáveis por combater-las, os antioxidantes (127,131).

Elevações nas concentrações das chamadas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), provenientes da oxidação de lipídios, (139,140), assim como, a diminuição dos níveis de glutathione (GSH), um dos mais importantes antioxidantes endógenos (141), tem sido evidenciadas durante a prática de diferentes tipos esforços (142) (143) (144), permitindo também considera-las, indicadores indiretos eficientes do estresse ao qual o sistema neuromuscular está sendo submetido (131).

Ainda, sabendo-se que o surgimento da fadiga muscular durante a sustentação de um esforço acarreta em sensações psicossomáticas como aumento da dor/desconforto e aumento da percepção subjetiva de esforço (1,145), a monitorização desses fatores utilizando-se de escalas numéricas que permitem quantificá-los (146,147), em sujeitos familiarizados a esse método, torna-se mais uma estratégia para investigar a dinâmica de surgimento desse fenômeno. Além disso, uma vez que estudos vem demonstrando que o aumento dessas sensações psicossomáticas pode estar diretamente relacionado à falha na atividade do córtex motor de gerar adequado estímulo elétrico para a ação muscular voluntária (1,9), acompanhá-las torna-se ainda mais relevante no cenário investigativo da fadiga muscular.

Todavia, além de detalhar o surgimento da fadiga muscular durante a execução de um exercício, vem tornando-se recorrente também a investigação dicotômica da etiologia desse fenômeno, atribuindo à ele características centrais (ex. falha na capacidade de gerar um nível voluntário de ativação muscular) e periféricas (ex. falha na transmissão do sinal elétrico da medula espinhal ao músculo e nos processos celulares envolvidos na contração tecidual) (3,102,111,113). Esses métodos investigativos, comumente, envolvem a análise dos níveis de força gerados por estímulos elétricos externos supramáximos (ex. promove o recrutamento de todas as unidades motoras disponíveis), aplicados no próprio músculo ou no feixe nervoso cuja sua ativação é dependente, durante a execução de CVMs ou no músculo relaxado (148).

Durante a execução de CVM, se o nível de força pico produzido consegue ser incrementado mediante esse tipo de estímulo, considera-se que há uma incapacidade de adequada geração e /ou transporte de estímulo elétrico pelo sistema nervoso central para prover os mesmos níveis de contração previamente observados, caracterizando essa

incapacidade como fadiga central (114,148,149). A aplicação de estímulos externos em diferentes áreas do sistema nervoso central tem sido também realizada, a fim de especificar ainda mais o conceito de fadiga central, distinguindo se as falhas na ativação muscular estão sendo ocasionadas por alterações na atividade do córtex motor ou da medula espinhal(3).

É o caso das técnicas avaliativas que envolvem a geração de potenciais de ação para atividade motora através da aplicação de estímulos elétricos cervicomedulares (CMEP) e estímulos elétricos ou magnéticos transcranianos (MEP), que associadas a informações eletromiográficas e de força produzida, auxiliam a inferir se o fator de maior relevância para o surgimento da fadiga central foi uma falha na medula espinhal ou no córtex motor, respectivamente (3,41).

De forma similar, quando estímulos externos, magnéticos ou elétricos, são aplicados ao músculo relaxado, uma vez que a resposta motora gerada não é influenciada pelo sistema nervoso central (córtex e medula espinhal), a constatação de declínios no nível de força pico alcançado é por muitas vezes considerado um indicador de fadiga periférica(3,148). Sugere-se ainda, que através da aplicação de estímulos elétricos duplos de alta (aproximadamente 100Hz) e baixa frequência (aproximadamente 10Hz), torna-se possível evidenciar se fibras de predominância glicolítica ou oxidativa, respectivamente, estão sendo mais afetadas pelo fenômeno da fadiga, nesse contexto, especificada como periférica(148).

Quando associado à monitorização eletromiográfica, estimulações externas no músculo relaxado promovem ainda mais detalhes sobre possíveis sítios etiológicos da fadiga periférica (148), especificando se as alterações no nível de força podem ser atribuídas à diminuição da excitabilidade dos neurônios motores, aspecto mesurável em condições submáximas de contração muscular através da resposta eletromiográfica denominada onda-H (150), ou, à falha na capacidade de condução desses neurônios, fator apreciável por meio da resposta máxima do artefato eletromiográfico chamado onda-M (151), obtido através de estimulações elétricas externas supramáxima.

2.1.3. Fadiga muscular e suas influências no desempenho físico

No ambiente de competição esportiva, sabe-se que diversos são os fatores que podem influenciar o desempenho do atleta, tais quais, condições climáticas (ex.

temperatura, umidade), equipamentos utilizados (ex. capacetes, trajes, chuteiras) e condições psicológicas (152), entretanto, uma vez que as competições buscam, na sua grande maioria, exaltar os indivíduos mais rápidos, mais fortes e mais técnicos, atletas necessitam ter a capacidade de extrair do corpo sua máxima capacidade funcional (153), nesse contexto, o fenômeno de fadiga, que acarreta danos à atividade do sistema neuromuscular (2,13), é sem dúvidas, um fator prejudicial determinante ao desempenho do atleta.

Marcora et al., (2008) buscando evidenciar o impacto negativo da condição de fadiga muscular no desempenho físico, submeteram 10 indivíduos à um protocolo de fadiga dos membros inferiores (100 *drop jumps* de 40cm, intervalados por 20 segundos, com duração total de 33 minutos) sem o habitual estresse metabólico observado nessas condições (ex. ausência de acúmulo de lactato, estresse cardiovascular durante exercício de apenas 58%) (155) e, 30 minutos após a indução de fadiga, a um esforço em carga fixa (80% da potência pico) até a exaustão. Os autores observaram que na presença de fadiga, constatada pela redução de 18% na força de extensores do joelho, os sujeitos apresentaram um menor tempo até à exaustão (636 s) em comparação à uma condição controle/repouso prévia ao esforço (750 s).

Posteriormente, De Morree e Marcora (2013), investigando os efeitos da fadiga muscular, induzida pelo mesmo protocolo usado por Marcora et al., (2008), sobre o desempenho em esforços de carga não constante, submeteram 10 homens saudáveis à esforço de ciclismo contrarrelógio em cicloergômetro no modo linear (ex. resistência na forma cadência dependente), na qual dever-se-ia atingir o maior trabalho possível (kJ) em um período de 15 min, 30 minutos após a indução de fadiga. Os autores constataram que na presença de fadiga (redução na força muscular dos extensores de joelho de -23%), os indivíduos apresentaram uma menor potência média e trabalho total gerados na prova contrarrelógio (240 W e 219 kJ), em comparação à condição controle/repouso (253 W e 230 kJ).

Amman e Dempsey (2008), similarmente, buscaram também investigar os efeitos negativos da fadiga muscular no desempenho de 8 ciclistas em uma prova contrarrelógio de 5Km e para isso, submeteram esses sujeitos, 4 minutos antes de executar a prova, à 3 condições prévias: um esforço até à exaustão à 83% da potência pico, um esforço à 67% da potência pico com duração idêntica, e uma condição controle (repouso). Excetuando-

se a condição controle, os esforços prévios à 83% e à 67% da potência pico acarretaram em uma fadiga muscular periférica, evidenciada por uma redução de -36% e -20% em repostas motoras evocadas por estímulo elétrico no músculo relaxado. Posteriormente, foi observado que a presença de fadiga acarretou em uma menor potência média e maior tempo de prova, quando induzida pelo esforço prévio à 83% (298 W; 7,8 minutos) e à 67% (332 W; 7,5 minutos) da potência pico, em relação à condição controle (347 W; 7,3 minutos).

É importante ressaltar que o protocolo de fadiga utilizado por Amman e Dempsey (2008), induziu alterações metabólicas e psicossomáticas relevantes nos sujeitos (ex. aumento nas concentrações sanguíneas de lactato, aumento na frequência cardíaca, aumento na percepção subjetiva de desconforto dos membros inferiores, dentre outros), dessa forma, diferente dos estudos de Marcora et al., (2008) e De Morree e Marcora (2013), Amman e Dempsey (2008) descrevem que a limitação de desempenho observada em seu estudo, pode ter sido desencadeada por diferentes aspectos do fenômeno de fadiga.

Uma vez que estímulos psicossomáticos (ex. aumento da percepção subjetiva de esforço) e aferentes, desencadeados por alterações metabólicas advindas das musculaturas envolvidas no exercício (ex. agonistas e sinergistas do movimento, músculos respiratórios), são apontados como causadores da diminuição reflexa da atividade do córtex motor (1,3), Amman e Dempsey (2008) especulam que, além de déficits musculares periféricos (ex. em nervos motores e músculos), aspectos centrais do fenômeno de fadiga também contribuíram para as limitações do desempenho físico nessas circunstâncias.

Perrey et al., (2010), por sua vez, investigando o desempenho de indivíduos ao longo de 12 *sprints* de 40m, intervalados por 30s, no exercício de corrida, observaram que o tempo de *sprint* aumentou +17% do primeiro para o último esforço (1º *sprint*: 5,87 segundos, 12º *sprint*: 6,76 segundos) e com base nos resultados de avaliações neuromusculares dos flexores do tornozelo, antes e após os esforços, concluíram que a instauração de fadiga muscular periférica, evidenciada por uma diminuição de -11% do pico de força produzido durante uma CVM, -20% da amplitude da Onda-M e -8 à -17% em repostas motoras evocadas no músculo relaxado, foi a responsável por acarretar a piora de desempenho observada.

De forma similar, Girard et al., (2013) ao submeter 12 sujeitos ativos à execução de 15 *sprints* (6 segundos de duração), intervalado por 30 segundos, de forma fragmentada (inicialmente 10 *sprints* e 6 minutos após os 5 restantes) em cicloergômetro, observaram que a potência pico produzida durante os esforços, diminuiu -12%, do primeiro ao décimo *sprint*, e -7,4% do décimo primeiro para o décimo quinto. Ao comparar o resultado de avaliações neuromusculares dos músculos extensores do joelho prévias e após os esforços, esses autores também concluíram que o surgimento da fadiga muscular periférica, evidenciada pela redução de -11,4% no nível de força produzido durante CVM, -43,2% na resposta motora evocada através de estímulos elétricos no músculo relaxado e -39,7% na resposta motora evocada através de estimulações magnéticas transcranianas em repouso, foi a principal responsável pela limitação de desempenho em esforços com essa característica.

Froyd et al., (2013) também investigando os efeitos que a fadiga muscular acarreta no desempenho humano, em esforços breves de alta intensidade e curto período de repouso, solicitaram que 10 indivíduos completassem 30.000 J de trabalho em dinamômetro isocinético realizando o movimento de flexo-extensão do joelho direito, o mais rápido possível, analisando a cada 6.000 J completos (20% do trabalho total), parâmetros periféricos de fadiga muscular. Os autores observaram que o tempo necessário para completar 20% do trabalho total, aumentou com o transcorrer da atividade, passando de 48 segundo nos primeiros 20% para 72 segundos, nos 20% finais. Em paralelo à piora de desempenho, os autores constaram uma diminuição no nível de força gerado durante CVM dos extensores do joelho (306N antes do início do esforço, 153N imediatamente após o esforço) e nas respostas motoras evocadas no músculo relaxado através de estímulos elétricos (70N antes do esforço à 23N imediatamente após o esforço).

Entretanto, assim como apontado por Amann e Dempsey (2008), e demais pesquisadores (1,9,104), a fadiga muscular, além de prejuízos na porção periférica desse sistema (abaixo da medula espinhal), pode decorrer também devido déficits na atividade do sistema nervoso central (medula espinhal e córtex motor). Dentre os causadores desse aspecto central da fadiga, um dos fatores mais investigados é o relacionado aos estímulos aferentes originados por alterações metabólicas nos ambientes intra e extracelulares e/ou pelo surgimento de sensações psicossomáticas (ex. dor/desconforto, aumento da percepção subjetiva de esforço), provenientes da sustentação de um esforço (1,3).

Amann et al., (2009), investigando a interação entre esses estímulos aferentes e a inibição reflexa da atividade do sistema nervoso motor central, submeteram oitos ciclistas a provas de 5Km contrarrelógio em diferentes situações: uma sobre o efeito do anestésico raquidiano fentanil, outra após receber uma injeção raquidiana de salina e outra sem nenhuma intervenção (controle). Uma vez que o fentanil é uma substância anestésica capaz de bloquear a condução nervosa dos grupamentos aferentes III/IV sem alterar a atividade das vias eferentes motoras, os autores levantaram a hipótese de que o bloqueio dessas vias, impediria a inibição da atividade do córtex motor acarretada por esses estímulos, promovendo uma consequente melhoria do desempenho.

A hipótese dos autores foi, entretanto, apenas parcialmente comprovada, uma vez que, sobre os efeitos do anestésico, os sujeitos tiveram uma maior potência média (358W) e menor tempo de prova (3,63 minutos) apenas na primeira metade do exercício, em relação à condição placebo (334W; 3,73 minutos) e controle (329W; 3,74 minutos), apresentando, entretanto, menor potência (304W) e maior tempo de prova (3,88 minutos) na metade final do esforço, em comparação à condição placebo (328W; 3,76 minutos) e controle (328W; 3,75 minutos), equalizando-se, ao final, o nível de desempenho total na prova entre condições controle (328 W; 7,49 minutos), placebo (330 W; 7,49 minutos) e experimental (328 W; 7,51 minutos).

Contudo, uma vez que o fenômeno de fadiga altera também outros aspectos funcionais do sistema neuromuscular além da sua capacidade de gerar força/potência (2,110), atletas de diversas modalidades também vivenciam, devido esse fenômeno, modificações na coordenação, propriocepção e padrões técnicos de execução de movimentos que, do mesmo modo, podem influenciar negativamente fatores ligados ao desempenho (161–163).

Nesse contexto, Nuno et al.,(2016) ao submeterem 20 jogadores de Handebol (12 profissionais e 8 amadores) à repetições de um circuito de esforços específicos para a modalidade (4 x 8 repetições do circuito, reduzindo o tempo de descanso entre cada repetição da primeira à quarta série de 80 à 10 segundos), objetivando induzir fadiga muscular, seguido de testes de arremesso ao gol após cada série de repetições, observaram que a velocidade de arremesso da bola diminuiu de forma gradativa do final da primeira série (-4.5%) ao final do quarta (-7%) e a acurácia, ao final da terceira (-37%) e quarta (-

73%) séries. Os autores atribuíram ao surgimento da fadiga muscular, o declínio na performance de arremesso.

De forma similar, Ahmed (2013), objetivando investigar os efeitos da fadiga muscular na acurácia de passe no basquetebol, submeteram 24 jogadores juvenis de basquete, à um protocolo de fadiga dos membros superiores utilizando, em dias distintos, um exercício de supino reto com halteres (*Dumbbell chest press*) e um de flexores de punho (*Dumbbell wrist curls*) à 70 e 90% das respectivas repetições máximas (5 x 15 repetições, intervalo de 60 segundos entre cada série), seguido de um teste específico (AAHPERD *Basketball Passing Test*) que avalia a acurácia de passe nessa modalidade.

Após a realização do exercício de supino reto, nas duas intensidades, os autores observaram uma redução na força de preensão manual na faixa de -5,8 à -12,58% que foi acompanhada pela redução na pontuação do teste de passe entre -19,35 e 29,11%. De forma semelhante, após o exercício de flexão de punho, observou-se uma redução na força de preensão manual, nas duas intensidades, na faixa de -6,4 à -15,48% e na pontuação do teste de passe, entre -14,88% e -29,11%. Assim como Nuno et al., (2016) Ahmed et al.,(2013) concluíram que a fadiga muscular, foi determinante para acometer a habilidade técnica dos sujeitos na execução dessa atividade.

Ainda, Dingwell et al.,(2010) investigando os efeitos que a fadiga muscular acarreta na técnica dos movimentos de ciclismo, submeteram 7 ciclistas bem treinados à um esforço de carga constante na $\dot{V}O_{2max}$ até a exaustão, associado à monitorização por EMG de músculos dos membros inferiores e análise cinemática dos movimentos desses segmentos. Os autores constataram que a instauração da fadiga muscular durante o esforço (evidenciada pelo declínio na frequência mediana do sinal eletromiográfico) acarretou um aumento no ângulo de flexão do tronco, no ângulo de abdução horizontal do quadril e na amplitude de movimento do tronco, diminuindo, porém, a amplitude de movimento da articulação do tornozelo.

Apesar de Dingwell et al.,(2010) inferirem que tais adaptações têm como objetivo favorecer a ação do glúteo máximo para viabilizar maior força de extensão do quadril e viabilizar um maior tempo de sustentação do esforço, à longo prazo, os autores apontam que elas podem estar estritamente relacionadas ao surgimento de lesões.

2.2. TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO

2.2.1. Abordagem histórica

A luz pode ser considerada um dos recursos terapêuticos mais antigos da humanidade (239, 240). Grandes civilizações da antiguidade como os Egípcios (3000a.c.), os Hindus (1400a.c.) e os Gregos (200a.c.), já recomendavam a helioterapia (ou seja, exposição à luz solar) para o tratamento de diferentes doenças de pele e para a restauração da saúde e do bem-estar geral (239,240). Avanços científicos modernos, porém, como a criação da lâmpada elétrica por Thomas Edson em 1879, viabilizaram a transição da helioterapia, para a terapia com luz proveniente de recursos artificiais, a fototerapia (240).

Nesse contexto, em 1893, o médico dinamarquês Niels Ryberg Finsen, impulsionado pelos achados de Down e Bunt em 1877 acerca do efeito bactericida dos raios ultravioleta, propôs um inédito tratamento com doses concentradas de luz, emitida através de lâmpadas elétricas à base de arcos de carbono, para 804 pacientes acometidos pela doença de pele *Lúpus vulgaris* (241, 242). Seus resultados clínicos noticiaram a cura de aproximadamente 83% dos pacientes e renderam a Finsen o prêmio Nobel de “Fisiologia ou Medicina” em 1903 (240, 241).

Por volta da segunda metade do século XX, entretanto, a invenção dos dispositivos laser (emissores de luz por emissão estimulada de radiação) e led (semicondutores capazes de converter corrente elétrica em espectro de luz) (243), associados ao conhecimento construído até aquela época acerca das propriedades físicas das ondas eletromagnéticas (ou seja, raios ultravioleta, raios infravermelho, dentre outros), impulsionaram o crescimento de investigações científicas sobre os efeitos desse tipo de radiação nos organismos vivos (240).

Nesse cenário, em 1967, o médico húngaro Endre Mester, objetivando reproduzir os achados de Paul Mg Guff acerca dos efeitos tumoricidas do recém-criado laser de ruby (249), realizou a implantação de células tumorais na região dorsal de ratos e submeteu o local a irradiações eletromagnéticas, também utilizando um laser de ruby (244). Uma vez que o dispositivo laser usado por Mester possuía uma baixa potência em comparação ao utilizado por Mg Guff, Mester não observou nenhum efeito tumoricida dessa terapia, constatando, porém, que os animais tratados, apresentaram um crescimento de pelagem e cicatrização tecidual mais acelerados em comparação aos animais não tratados. (244,245).

As descobertas de Mester em 1967 caracterizam-se como os primeiros relatos científicos sobre os efeitos estimulantes da radiação eletromagnética nos organismos vivos (244), tais achados acabaram por estimular a investigação das influências dessa modalidade de terapia, a partir de então chamada de terapia laser de baixa potência (TLBP), em diferentes condições patológicas como úlceras cutâneas (164,165) e artrite reumatoide (247,248). As investigações acerca da TLBP continuaram nas década seguintes, objetivando, principalmente, esclarecer os mecanismos responsáveis por seus efeitos (29,166–169).

Atualmente a TLBP é utilizada e investigada em diversas áreas, desde o tratamento de condições inflamatórias (20,170), algicas (19,171) e patológicas diversas (ou seja, estresse oxidativo, neurotoxicidade) (172,173), assim como, para o retardo das marcas do envelhecimento (ou seja, aparecimento de rugas, queda de cabelo) (174) e melhoria do desempenho físico (16,175).

Devido a ampla utilização dos dispositivos led para também realizar essa modalidade de terapia (cuja eficácia em interagir com os organismos vivos, assim como os dispositivos laser, é atualmente comprovada) (174,176), e em razão dos efeitos estimulantes e inibitórios que essa intervenção pode acarretar nas atividades celulares, a TLBP foi novamente renomeada, passando a ser relatada como terapia de fotobiomodulação (TFBM) (15), conceitualmente definida como a aplicação de ondas eletromagnéticas, visíveis e/ou invisíveis (400-1100nm), de maneira não térmica, através de dispositivos laser e/ou led de baixa potência (5–500mW), objetivando promover alterações nas atividades biológicas (177).

2.2.2. Parâmetros de operacionalização

O feixe de luz é considerado um espectro eletromagnético e, portanto, se desloca no espaço através de um comportamento ondulatório, possuindo características físicas como pico, vale e frequência (174,177). Atualmente, os dispositivos emissores de espectros eletromagnéticos empregados na TFBM são os dispositivos laser e os dispositivos led, que apesar de serem efetivos em acarretar fotobiomodulação (176), operam de modos diferentes (30,177).

Os dispositivos laser emitem espectros eletromagnéticos com comprimento de onda único (monocromaticidade), que estão em fase no tempo e espaço (coerência),

deslocando-se na mesma direção, de forma não divergente (colimação) (174,177). Por outro lado, os espectros emitidos pelos dispositivos led não estão em fase no tempo e espaço (não coerente) e se deslocam na mesma direção de forma divergente (não colimada) (174,176,177).

Ambos os dispositivos operam emitindo espectros com os mais diversos comprimentos de onda (400-470nm, cor azul; 470-550nm, cor verde; 630-700nm, cor vermelha; 700-1200nm, infravermelho) e podem possuir aspectos estruturais diferentes, apresentando-se com diodos simples ou no formato de *clusters* com vários diodos agrupados, viabilizando uma maior área de irradiação em menor tempo (30,174,178). Ainda, a utilização de *clusters* mistos (ou seja, contendo diodos com diferentes comprimentos de onda) tem sido cada vez mais utilizada, a fim de promover uma estimulação mais ampla e efetiva dos cromóforos celulares (ou seja, citocromo c oxidase, grupos heme nas hemoglobinas e mioglobinas, dentre outros) (169,179).

De uma forma geral, quanto maior o comprimento de uma onda eletromagnética, maior sua capacidade de penetração nos tecidos biológicos (174,177,180), entretanto, além da capacidade de penetrar no tecido, é necessário que a energia proveniente do espectro eletromagnético seja absorvida pelas células alvo para, só então, gerar algum efeito biológico (primeira lei da fotoquímica) (29). Dessa forma, devido barreiras fisiológicas como melanina, hemoglobina e a água, a janela de tratamento ideal para uma boa relação penetração/absorção em humanos é entre 600-1000 nm (174,177,181).

Outra característica específica aos dispositivos e que influencia o perfil de interação da TFBM com as atividades celulares é a potência de saída do espectro (expresso em mW), que representa a taxa de irradiação de fótons (energia [expressa em J]) com a qual o aparelho está operando (171,182). A grande maioria dos dispositivos, atualmente, funcionam dentro de uma faixa de 5 à 500 mW(28,177) e, apesar de maiores potências de saída demandarem menos tempo para atingir uma determinada “dose alvo” de tratamento, alguns autores propõem que potências de saída elevada podem provocar um efeito inibitório das atividades biológicas (180), sendo sugerido recentemente, a utilização de potências inferiores à 200mW (175).

Todavia, além das características operacionais dos dispositivos, aspectos subjetivos da intervenção parecem ser determinantes para a efetividade da TFBM, tais quais, a área total irradiada (expressa em cm²) e a quantidade total de energia depositada

(expressa em J) sobre a estrutura alvo (171,177). Sobre a área de irradiação, há o consenso acerca da importância de se abranger o máximo de superfície possível durante a intervenção, para viabilizar uma efetiva influência da TFBM sobre a estrutura alvo do tratamento (171,177)

Acerca da energia total irradiada (expressa em J), também chamada de “dose”, é estabelecido na literatura, fundamentado na lei de Arndt-Schulz, o chamado efeito “dose-resposta” da TFBM, que descreve a incapacidade dessa intervenção em influenciar as atividades celulares quando realizada em uma dose muito baixa, causando, entretanto, um efeito inibitório, quando altas doses são aplicadas na estrutura alvo (177,183). Dessa forma, descreve-se na literatura a existência de uma faixa ideal de dose, ou janela terapêutica, para acarretar a estimulação das atividades biológicas utilizando a TFBM (180,183).

No que se refere à ciências do esporte, revisões recentes vêm descrevendo o efeito “dose-resposta” da TFBM em humanos, quando utilizada para promover a melhoria do desempenho físico, sugerindo-se a janela terapêutica de 20-60 J quando os alvos da intervenção forem pequenos grupos musculares e de 60-300J para grandes grupos musculares(16,175). Torna-se importante ressaltar ainda que, além da magnitude da dose total irradiada, a forma como sua aplicação é distribuída ao longo da estrutura alvo, parece também, ser determinante para a efetividade dessa intervenção (171).

Tendo em vista a amplitude e importância dos parâmetros operacionais envolvidos na realização da TFBM, a comunidade científica vem buscando normatizar o uso dessa intervenção (16,171,184). Dessa forma, determinar faixas ideais de potência de saída (185,186) e dose para um determinado objetivo (ou seja, controle da inflamação, alívio da dor, melhora do desempenho físico), em estruturas específicas (ou seja, estruturas articulares, tecido muscular)(16,170,180,183), tem sido o propósito de investigação de numerosos estudos envolvendo a TFBM.

A relativização da potência de saída do espectro eletromagnético pela área de emissão do aparelho, parâmetro conhecido como irradiância (expresso em mW/cm^2), assim como, a relativização da quantidade total de energia emitida por uma unidade de área, parâmetro conhecido como fluência (expresso em J/cm^2)(171), são algumas das estratégias utilizadas na tentativa de padronizar os parâmetros de uso da TFBM,

viabilizando uma comparação mais acurada dos efeitos dessa intervenção sobre diferentes situações (184).

Entretanto, divergências conceituais sobre parâmetros operacionais ainda cercam esse contexto de discussão e um consenso para normatizá-los ainda está por surgir (187). Concomitantemente, aspectos humanos individuais como tonalidade da pele, nível hídrico no momento da terapia, percentual de gordura do segmento que se deseja tratar (181), assim como, subjetividades inerentes a cada aplicador desse tipo de terapia (ou seja, como a pressão do aparelho sobre a área a ser tratada) (171,178), parecem influenciar a interação da TFBM nas atividades biológicas, contribuindo para dificultar a comparação entre resultados provenientes de investigações sobre essa terapia e, conseqüentemente, a padronização dos parâmetros de uso desse recurso.

2.2.3. Mecanismos de ação

De acordo com a teoria física do quantum, descrita por Einstein no início do século XX, a luz é composta por pequenos “pacotes” de energia denominados fótons (177). Cromóforos são estruturas encontradas nas células de diversos organismos que possuem a capacidade de absorver essa energia proveniente do feixe de luz (visível e invisível) (29). Após absorver energia, os cromóforos estimulam outras moléculas ao seu redor, desencadeando reações químicas que alteram o metabolismo celular. Esse tipo de interação, é considerado o mecanismo de ação primário da TFBM (168).

Em células de mamíferos, estudos vêm demonstrando que a enzima citocromo c oxidase (CCO), situada na parte final da cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial, é o principal cromóforo a ser influenciado pela irradiação de espectros eletromagnéticos, visíveis e invisíveis (166,188). Após absorver energia, a CCO consegue acelerar o processo de transporte de elétrons pela cadeia respiratória, aumentando o consumo de oxigênio e a produção de moléculas de ATP (29,168). Essas alterações no funcionamento do metabolismo aeróbio de produção de energia têm sido sugeridas como o principal efeito da TFBM nas células eucariontes (177,189).

Além dos estudos em mitocôndrias isoladas que demonstraram os efeitos da TFBM em aumentar a atividade da CTE, a produção de ATP e O_2 (166), também se evidenciou a capacidade da TFBM em aumentar a síntese de ATP após a irradiação completa da célula (190). Em organismos vivos, Perini et al., (2016) observaram um

aumento do consumo basal e máximo de oxigênio em camundongos após tratamento com TFBM por 10 dias. Ferraresi et al., (2015b) por sua vez, também relataram um aumento na síntese de ATP nos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos após uma sessão de tratamento com TFBM. Em humanos, apenas De Marchi et al., evidenciaram um maior consumo máximo de oxigênio após o tratamento com TFBM dos membros inferiores. Até o momento, não há relatos sobre o aumento da síntese de ATP em humanos através dessa modalidade de terapia (24).

Investigações in vitro demonstraram que maiores concentrações de ATP celular viabilizam, após alguns minutos, uma maior atividade de transportadores iônicos dependentes de energia localizados na membrana plasmática, como as bombas de Na^+/K^+ , fundamentais na manutenção da função das células nervosas (ex. condução do impulso elétrico) e musculares (ex. contração tecidual), assim como as bombas de Ca^{++} , importantes para o controle das concentrações desse íon no interior da célula (193). Infere-se que outros transportadores ativos, como as bombas de Ca^{++} presentes no retículo sarcoplasmático das células musculares, também podem ter sua atividade positivamente influenciada pela TFBM (30,189).

Estudos in vitro, evidenciaram também, a capacidade da TFBM em elevar os níveis de AMP cíclico (AMPC) celulares (194–196), molécula importante para a promoção de processos fisiológicos como: ativação de enzimas, permeabilidade vascular, síntese proteica, grau de contração do músculo liso e controle da inflamação. Vem se demonstrando, do mesmo modo, através de ensaios in vitro, que as concentrações do íon cálcio (Ca^{++}) no interior da célula, responsável por desencadear fenômenos fisiológicos como transmissão do sinal elétrico, expressão gênica, contração muscular e apoptose (197) também podem se elevar após a TFBM (167,198,199).

Apesar da maior produção de ATP, um aumento da atividade de enzimas da CTE acarreta também em um aumento das (ERO)(168,172,200). Devido a conversão apenas parcial das moléculas de oxigênio utilizadas pela mitocôndria em água, há um natural acúmulo de oxigênio e consequente formação de ânions superóxido (O_2^-) no interior dessa organela (177) e quando por alguma situação a atividade da CTE é alterada, tanto estimulada (ex. TFBM) como inibida (ex. ligação com o óxido nítrico, toxicidade por azida de sódio), há um aumento na produção dessas moléculas (28).

Embora as ERO sejam essenciais para diversos processos fisiológicos (ex. fosforilação de proteínas, produção de fatores de transcrição gênica, diferenciação celular e ação imunitária), (201) concentrações elevadas dessas moléculas são nocivas à proteínas e lipídios presentes na membrana plasmática, assim como, ao próprio DNA da célula (202), sendo descrito na literatura a associação do excesso de ERO com o surgimento e manutenção de doenças neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, dentre outras (203).

A TFBM também vem se mostrando eficaz em afetar um fenômeno fisiológico no qual a molécula de óxido nítrico (NO) está envolvido, a vasodilatação (204). O processo de vasodilatação mediado pelo NO é baseado na sua capacidade de estimular uma cascata de reações específicas que levam ao relaxamento das células musculares lisas, viabilizando o aumento do diâmetro do vaso e consequentemente o maior transporte de sangue (205). Investigações pioneiras desse mecanismo demonstraram a capacidade da irradiação com espectros na faixa de 100-500 nm (ex. ultravioleta e faixa azul) em promover a vasodilatação de artérias isoladas através do mecanismo que envolve a molécula de NO (206,207) .

Alguns comprimentos de onda específicos também têm apresentando a capacidade de estimular as moléculas de hemoglobina (ex. cromóforas) presentes nos glóbulos vermelhos do sangue, acarretando na liberação das moléculas de NO por elas transportadas (204,208). Dessa forma, infere-se que em áreas irradiadas com a TFBM, ocorra um aumento nas concentrações locais de NO devido sua dissociação da hemoglobina, facilitando a ocorrência do processo de vasodilatação. Evidências do aumento de fluxo sanguíneo local após tratamento com TFBM vem sendo demonstradas tanto em ensaios com animais como em humanos(209–211) .

Maegawa et al., (2000) investigando os efeitos da TFBM sobre o plexo vascular mesentérico de ratos, observaram que essa terapia promoveu uma vasodilatação das arteríolas, um minuto após a irradiação, com um aumento aproximado de 120% em relação ao diâmetro inicial, após 30 minutos. Corroborando com os achados de investigações em modelo animal, Larkin et al.,(2012) em um estudo cruzado com 10 homens adultos e saudáveis, observaram que a TFBM foi eficaz em aumentar o fluxo sanguíneo do antebraço, mensurado através de pletismografia, um e dois minutos após o tratamento.

2.2.4. Terapia de fotobiomodulação e suas influências na fadiga muscular e desempenho físico

Diante de efeitos específicos da TFBM sobre atividades biológicas, como aumento da ressíntese de ATP através da via aeróbia (29,190) e sobre condições fisiológicas específicas, tais quais reparação tecidual(212,213), controle da dor (170) e inflamação (195,214), a comunidade científica passou a também investigar as possíveis influências que esse método poderia ter sobre a dinâmica de trabalho do sistema neuromuscular, no surgimento do fenômeno de fadiga mediante a sustentação de um esforço e, conseqüentemente, no desempenho físico.

Nesse contexto, um dos estudos precursores é o realizado por Lopes-Martins et al., (2006), na qual os autores submeteram 32 ratos à 6 contrações tetânicas do músculo tibial anterior (intervaladas por 10 minutos) até perda de 50% do nível inicial de força atingido, aplicando previamente à primeira contração TFBM (LASER Ga-Al-As 635nm) nas doses de 0,5J (n=8), 1J(n=8), 2,5J (n=8) e 0 J (n=8). Os autores observaram que a TFBM nas três doses investigadas provocou maiores valores de força pico em cada uma das 6 contrações realizadas em comparação ao grupo controle e que apenas as doses de 0,5 e 1 J acarretaram em um maior tempo até o decaimento de 50% do nível de força gerado, concluindo que esse método foi efetivo em melhorar o desempenho muscular e retardar o surgimento da fadiga em ratos saudáveis.

Posteriormente, Leal Junior et al., demonstraram em uma série de estudos (cruzados-randomizados) com atletas de voleibol, a eficácia da TFBM aplicada com diferentes parâmetros (comprimentos de onda de 635 à 850nm e doses totais de 20-60 J), aproximadamente 10 minutos antes da execução do exercício, em aumentar o tempo até à exaustão e o número de repetições de flexo-extensão do cotovelo com carga à 75% de uma repetição máxima (1RM), observando incrementos no tempo até a exaustão e no número de repetições que variaram de 8,1% - 39% e 11,5% - 29,4% respectivamente, quando comparado à condição placebo (21–23,31).

Os achados de Leal Junior et al., (2008, 2009a, 2009c, 2010) foram posteriormente corroborados por outros autores. De Almeida et al., (2012), ao submeterem 10 sujeitos destreinados, de forma cruzada-randomizada, à um protocolo de contração isométrica máxima dos flexores de cotovelo durante 1 minuto após tratamento com TFBM em diferentes modalidades (comprimento de onda de 660nm ou 830nm e dose total de 20 J),

observaram que o pico de força e a força média atingidos foram maiores após TFBM visível (12,14 e 13,09%, respectivamente) e infravermelha (14,49 e 13,24%, respectivamente), quando comparado à condição placebo, não havendo diferença entre as duas modalidades de terapia.

Baroni et al.,(2010), buscando investigar os efeitos da TFBM em grupamentos musculares de maior volume, submeteram 17 voluntários de forma cruzada-randomizada, à um protocolo de fadiga isocinética dos músculos extensores do joelho (30 contrações máximas à 180 graus/segundo) após TFBM em três pontos do quadríceps (comprimento de onda misto, 660 e 850 nm; dose total de 125,1 J) ou tratamento placebo (aparelho desligado). Os autores observaram que após o exercício, maiores valores de torque foram observados durante CVM dos extensores do joelho quando os sujeitos foram submetidos à TFBM efetiva ($237,68 \pm 48,82$ Nm) em relação à condição placebo (225,68 Nm), concluindo que o menor decaimento do nível de força reflete um melhor desempenho físico dos sujeitos após a TFBM.

Vassão et al., (2016), também investigando os efeitos da TFBM (comprimento de onda de 808 nm e dose total de 56 J) aplicada no membro inferior, constataram um aumento do índice de fadiga eletromiográfico do músculo reto femoral (índice de fadiga = mediana do sinal das últimas 20 contrações / mediana do sinal da primeiras 20 contrações), após a realização de 60 contrações isocinéticas de extensão do joelho, quando comparado à condição placebo, não observando porém, alterações no nível de desempenho durante a execução do esforço. Uma vez o declínio da mediana do sinal EMG é observado durante condições de fadiga muscular, os achados de Vassão et al., (2016) corroboram com os achados de Baroni et al.,(2010), nos quais a TFBM foi efetiva em diminuir o nível de fadiga na fase final do esforço.

Macedo e colaboradores (2016), por sua vez, ao submeterem 60 voluntários de forma cruzada-randomizada à 100 contrações isocinéticas máximas dos flexores plantares após TFBM no músculo sóleo (comprimento de onda de 808 nm e dose de total de 25 J) ou condição placebo (aparelho desligado), observaram que esse método acarretou em um menor índice de fadiga mensurada por dinamometria (índice de fadiga = trabalho realizado no terço inicial/ trabalho realizado no terço final), quando comparado ao grupo placebo. Mais uma vez, esses resultados reforça a ideia de que a TFBM é efetiva em reduzir o nível de fadiga muscular durante a realização de um esforço físico.

Entretanto, apesar das evidências que apontam a TFBM como recurso ergogênico eficiente na realização de esforços com grupos musculares isolados, alguns autores refutam esses achados. Higashi et al., (2013) ao submeterem 20 sujeitos de forma randomizada-cruzada à um protocolo de fadiga (máximo de repetições de flexo-extensão do cotovelo à 75% de 1 RM durante 1 min) após TFBM (comprimento de onda de 808 nm, dose total de 56 J) ou condição placebo (aparelho desligado) no músculo bíceps braquial, verificaram que esse método não foi efetivo em melhorar o desempenho físico dos sujeitos, cujo número de repetições realizadas foi de $25,1 \pm 9,89$ após intervenção ativa e $22,6 \pm 7,58$ na condição placebo.

De forma similar, Dos Reis et al.,(2014) ao submeterem, de forma cruzada-randomizada, 27 jogadores de futebol amadores à um protocolo de indução à fadiga, caracterizado por repetições de extensão do joelho à 75% de 1RM até a exaustão, após TFBM (comprimento de onda de 830 nm; dose total de 25,2 J) ou tratamento placebo (aparelho desligado) em toda região anterior da coxa, observaram que essa terapia não foi efetiva em melhorar o desempenho físico, uma vez que o número de repetições executadas pela condição placebo e após tratamento ativo foram, respectivamente, $39,9 \pm 17,1$ e $31,0 \pm 11,2$.

Uma vez que a TFBM parece ter uma “janela terapêutica” ideal, na qual tratamentos em baixas doses não influenciam as atividades biológicas, e em doses elevadas, porém, há uma supressão dessas, Higashi et al., (2013), assim como Dos Reis et al., (2014), inferem que a baixa dose de TFBM utilizada em seus estudos foi um fator determinante para a não efetividade desse método em melhorar o desempenho dos sujeitos.

Assim como nos exercícios com musculaturas isoladas, contradições acerca dos efeitos da TFBM na melhoria do desempenho também são observadas em esforços com maior complexidade de execução e mais semelhantes aos gestos motores observados na prática do movimento humano. De Marchi et al., (2012) em uma das investigações precursoras acerca dos efeitos da TFBM em gestos motores complexos, submeteram 22 sujeitos de forma randomizada-cruzada, à esforço incremental em esteira (inclinação fixa de 1%, velocidade inicial de 3 km/h, incrementos de 1 km/h a cada minuto), imediatamente após aplicação de TFBM em todo o membro inferior (comprimento de onda: 810nm, dose total no quadríceps: 180 J, dose total nos isquiotibiais:120 J e dose

total no tríceps sural: 60J) ou condição placebo (aparelho desligado). Os autores observaram que, de fato, a TFBM acarretou em uma melhoria do desempenho físico, refletido por um aumento de 2% no tempo até à exaustão.

Além disso, esses autores também observaram que o grupo submetido à TFBM apresentou menores valores de marcadores séricos de estresse oxidativo (ex. substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, enzima superóxido dismutase). Uma vez que o estresse oxidativo é apontado como um dos causadores do fenômeno de fadiga (4), os autores concluíram que o melhor desempenho dos sujeitos ocorreu devido um retardo no surgimento da fadiga muscular, ocasionado pela atenuação do estresse oxidativo durante o esforço.

Corroborando com os achados de De Marchi et al., (2012), Miranda et al., (2016), observaram que a TFBM (comprimento de onda misto: 905, 875 e 640 nm, dose total de 270 J no quadríceps, 180 J nos isquiotibiais e 60 J no tríceps sural) também foi efetiva em aumentar o tempo até a exaustão (+5,1 %) em um teste incremental (inclinação fixa de 1%, velocidade inicial de 3 km/h, incrementos de 1 km/h a cada minuto) em 20 sujeitos, comparado ao tratamento com o aparelho desligado (estudo cruzado-randomizado).

Todavia, (34), ao investigar os efeitos da TFBM no desempenho do teste de *Wingate*, submeteram 20 atletas (9 de voleibol e 11 de futebol), à esse esforço, de forma cruzada-randomizada, imediatamente após TFBM na região do quadríceps (comprimento de onda 830 nm, dose total de 15 e 20 J em cada coxa, nos jogadores de futebol e voleibol, respectivamente) e observaram que esse recurso não foi eficaz em aumentar o trabalho total realizado pelos atletas de voleibol em comparação à condição placebo ($21.8 \pm 2,06$ J vs. $22.4 \pm 2,84$ J), assim como pelos atletas de futebol em comparação à condição placebo ($16.2 \pm 1,63$ J vs. $16.2 \pm 1,7$ J).

De forma similar, Leal Junior et al., (2009b), ao submeteram 8 atletas de voleibol ao teste de *Wingate* após três modalidades de intervenção no quadríceps: modalidade 1 (TFBM com comprimento de onda de 830 nm e dose total de 12 J) ou modalidade 2 (TFBM com comprimento de onda de 660 nm e dose total de 83,4J) ou tratamento placebo (aparelho desligado) constaram que a TFBM não foi efetiva em melhorar o desempenho do sujeitos, refletido pelos parâmetros potência pico (modalidade 1: $12,2 \pm 0,46$ W/kg, modalidade 2: $12,31 \pm 0,83$ W/Kg e placebo: $12,36 \pm 0,59$ W/Kg) e potência média

(modalidade 1: $9,55 \pm 0,35$ W/kg, modalidade 2: $9,58 \pm 0,83$ W/Kg e placebo: $9,64 \pm 0,39$ W/Kg) atingidos durante o teste.

Alves et al., (2014), investigando os efeitos da TFBM em cicloergômetro, submeteram 18 indivíduos (9 homens e 9 mulheres), de forma randomizada-cruzada, à um teste incremental (incrementos de 15 e 20W a cada minuto para mulheres e homens, respectivamente), após TFBM (comprimento de onda de 850 nm, dose total de 42 J no quadríceps e 14 J no tríceps sural) ou tratamento placebo (aparelho desligado) e observaram que esse método não foi efetivo em aumentar o tempo até a exaustão dos participantes, que foi de 648 ± 95 segundos após intervenção placebo e 648 ± 87 segundos após tratamento ativo.

Corroborando com os achados de Leal Junior et al.,(34,35) e Alves et al., (2014), Malta et al., (2016), investigando os efeitos da TFBM sobre o desempenho em esforço supramáximo, submeteram 15 sujeitos, de forma cruzada-randomizada, à corrida em esteira com carga fixa (115% da intensidade associada ao $VO_{2máx}$) até à exaustão, após TFBM (comprimento de onda misto: 660 nm e 850 nm; dose total de 120 J no quadríceps, 120 J nos isquiotibiais e 60 J no tríceps sural) ou tratamento placebo (aparelho desligado) e também não observaram melhora no tempo até à exaustão dos sujeitos, que foi de $154,6 \pm 36$ segundos após tratamento ativo e $155,5 \pm 37$ após intervenção placebo.

Desse modo, seja em gestos motores simples (ex. flexo-extensão do cotovelo e joelho) ou complexos (ex. ciclismo e corrida), os estudos que investigaram a efetividade da TFBM em retardar o surgimento da fadiga muscular e incrementar o desempenho físico apresentam achados bastante controversos. Apesar dos esforços em padronizar parâmetros de operacionalização (ex. comprimento de onda, potência de saída do aparelho, dose total utilizada, área total irradiada)(30,221), a TFBM ainda não apresenta diretrizes técnicas que orientem seu uso, dessa forma, a ampla divergência nas características dos protocolos de tratamentos, é comumente apontada como um fator determinante para a ausência de consenso sobre a efetividade ou não desse recurso nesse cenário de utilização(17,36).

Além disso, particularidades nos procedimentos utilizados nas investigações sobre os efeitos da TFBM na fadiga muscular e desempenho, também são sugeridas como fatores causais da divergência de achados sobre a efetividade desse recurso nesse cenário

de utilização (16). Dentre eles, o recrutamento de voluntários não treinados para executar esforços máximos na qual não são familiarizados (ex. ciclismo com carga incremental e corrida em carga fixa supramáxima até à exaustão), assim como, de sujeitos treinados, mas, não habituados ao exercício proposto (ex. jogadores de voleibol e futebol executando teste de *Wingate*), são apontados como fatores externos à TFBM que também podem influenciar o desempenho físico dos sujeitos (nesse caso, de forma negativa) e, de certa forma, competir com os possíveis efeitos advindos desse recurso (16,27).

Do mesmo modo, outro aspecto que parece contribuir para a não efetividade da TFBM é o tipo de esforço empregado para investiga-la. Uma vez clara seus efeitos sobre o metabolismo aeróbio (ex. aumento da atividade da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria), exercícios em que essa via metabólica de produção de energia não é determinante para o desempenho, como o teste de *Wingate* e corrida em intensidade supramáxima, parecem não ser situações físicas cujo esse recurso poderia ser efetivamente útil em retardar o surgimento da fadiga muscular e melhorar o desempenho(16,27).

Ainda, além das divergências sobre a efetividade desse recurso nesse cenário, mesmo em estudos que observaram uma capacidade da TFBM em melhorar o desempenho físico, não há uma descrição clara sobre como essa intervenção influenciou a dinâmica de trabalho do sistema neuromuscular. A grande maioria dos estudos, avaliou, além do desempenho físico, apenas as condições iniciais e após exaustão do sistema neuromuscular, seja de forma direta (ex. nível de força, potência produzidos) e/ou indireta (ex. concentrações de lactato sanguíneas). Como discutido anteriormente, uma vez que o fenômeno de fadiga é inerente ao sistema neuromuscular (2), constatar a sua presença ou não através da comparação de resultados prévios e após esforços é uma estratégia limitada de investigação desse fenômeno e sua interação com o desempenho físico (13,14), assim como, de recursos que objetivam influenciá-lo.

Em um dos poucos estudos que investigou a dinâmica de trabalho do sistema neuromuscular durante a realização de um esforço após tratamento com TFBM, Rossato et al., (2016) submeteram 10 sujeitos, de forma cruzada-randomizada, à um protocolo de fadiga muscular dos flexores de cotovelo (manutenção de uma contração isométrica submáxima de flexão de cotovelo até à exaustão) após duas modalidade de TFBM no músculo bíceps braquial (TFBM₁: comprimento de onda misto, 670, 850, 880 e 950 nm;

dose de 60J; TFBM₂: comprimento de onda misto, 670 e 850 nm; dose total de 60J) e duas intervenções placebos (aparelhos desligados), associado à monitorização da atividade elétrica da musculatura envolvida no esforço durante toda a sua duração.

Os autores observaram que as duas modalidades de TFBM acarretaram em um tempo até exaustão superior em comparação às condições placebos (15% comparando a TFBM₁ com a respectiva condição placebo; 14% comparando a TFBM₂ com a respectiva condição placebo), não havendo diferença entre as terapias. Entretanto, apesar da efetividade em melhorar o desempenho físico, não foram evidenciadas alterações na atividade elétrica muscular após a TFBM, mensurada através da EMG (RMS e frequência mediana do sinal). Dessa forma, apesar de sua efetividade em melhorar o desempenho físico, os autores concluíram que a TFBM não foi capaz de alterar os padrões de funcionamento neuromusculares, mensurado através da EMG.

Recentemente, entretanto, Lanferdini et al., (2017) ao submeter 20 ciclistas treinados, de forma cruzada-randomizada, à um teste em carga constante na $\dot{V}O_{2max}$ até à exaustão, após TFBM na região do quadríceps com três doses distintas (comprimento de onda 810 nm; dose total: 135 ou 270 ou 405 J, em cada perna) ou uma intervenção placebo (aparelho desligado), associado à monitorização da atividade elétrica dos músculos vasto lateral, vasto medial e reto femoral por EMG durante todo o esforço, constataram que esse método foi efetivo em aumentar o tempo até à exaustão e alterar o padrão de funcionamento neuromuscular.

Os autores observaram que a TFBM na dose de 135 e 270 J provocou um aumento do tempo até à exaustão em 15 e 9%, respectivamente, em comparação à condição placebo (149±23 segundos). Além disso, foi evidenciado que a dose de 135 J acarretou em um maior valor de frequência do sinal EMG em altas faixas de alta frequência (193,45-300,80 Hz, representativas da atividade de unidades motoras de maior diâmetro) no trecho final do exercício (10 segundos finais), em relação aos trechos inicial (10 segundos iniciais) e médio (10 segundos intermediários) do esforço, assim como, um maior valor de frequência nas faixas de alta frequência no trecho final do esforço, em comparação à intervenção placebo.

Diante de seus resultados, Lanferdini et al., (2017) concluíram que a da TFBM (na dose de 135 J) foi capaz de melhorar o desempenho físico por promover uma maior

atuação de unidades motoras de maior diâmetro nos estágios finais do exercício, inferindo que essa alteração no funcionamento neuromuscular ocorreu devido fatores como aumento local da disponibilidade de ATP, microcirculação e oxigenação tecidual.

Corroborando com os achados de Lanferdini et al.,(27), Dellagrana et al., (250) investigando os efeitos da TFBM sobre o desempenho em corrida, submeteram, de forma cruzada-randomizada, 15 corredores recreacionais à testes de tempo até a exaustão na intensidade do $\dot{V}O_{2\text{pico}}$, precedidos por TFBM nas doses de 15 J, 30 J, 60 J, ou 0 J (condição placebo com aparelho desligado), realizando um total de 14 aplicações em cada membro inferior, imediatamente antes dos testes (dose total - quadríceps femoral: 120 J, ou 240 J, ou 480 J, ou 0 J; isquiotibiais: 60 J, ou 120 J, ou 240 J ou 0 J; tríceps sural: 30 J, ou 60 J, ou 120 J, ou 0 J). Os autores observaram que apenas as TFBM na doses de 15 J por ponto e 30 J por ponto, acarretaram em aumentos no tempo até à exaustão, que corresponderam, respectivamente, à +3.06% e +3.41%, em comparação a condição placebo.

Ainda, os mesmos autores, investigando os efeitos da TFBM sobre respostas respiratórias e metabólicas, submeteram os mesmos voluntários (n=15) à 5 minutos de corrida submáxima (8 km/h e 9 km/h) em esteira, precedidas pela TFBM nos mesmos parâmetros descritos acima, monitorando o $\dot{V}O_2$ durante os esforços e a concentração pico de lactato sanguínea após exercício. Os autores observaram que a TFBM na dose de 30 J por ponto acarretaram na diminuição do $\dot{V}O_2$ na corrida de 8 km/h (-3.01%) e de 9 km/h (-3.03%) em comparação à condição placebo, enquanto as doses de 15 J e 60 J por ponto, acarretaram em diminuições no $\dot{V}O_2$ de -2,98% e -3,87% apenas na corrida à 9 km/h, em comparação à condição placebo. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a TFBM foi efetiva em melhorar a economia de corrida dos voluntários em atividades submáximas. Por fim, os autores sugerem (com base na inferência baseada na magnitude do efeito) a dose ideal de 30 J por ponto, tanto para a melhora da economia de corrida submáxima como para a melhora do desempenho (tempo até à exaustão na $\dot{V}O_{2\text{pico}}$).

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Investigar os efeitos de duas doses de TFBM sobre parâmetros da atividade muscular, tempo até a exaustão em exercício retangular no domínio severo em ciclo ergômetro e nos aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular.

3.2 – Objetivos específicos

I) Avaliar os efeitos de duas doses de TFBM sobre os aspectos global, central e periférico da fadiga muscular após exercício no domínio severo até à exaustão em ciclo ergômetro.

II) Avaliar os efeitos de duas doses de TFBM sobre o tempo até à exaustão de um exercício retangular no domínio severo em ciclo ergômetro.

III) Avaliar os efeitos de duas doses de TFBM sobre a cinética das concentrações de lactato sanguíneas, gasometria sanguínea, atividade elétrica muscular e troca gasosa respiratória durante exercício retangular no domínio severo até à exaustão em ciclo ergômetro.

4. HIPÓTESE

A TFBM tem sido demonstrada como um recurso capaz de estimular enzimas localizadas na cadeia transportadora de elétrons (CTE) da membrana interna mitocondrial, acarretando em um aumento da produção de ATP através da via aeróbia (29). Infere-se que viabilizar a produção de maiores níveis de ATP durante a execução de um esforço ocasionaria um funcionamento adequado mais prolongado das bombas iônicas presentes no sarcolema muscular e retículo sarcoplasmático (ex. bomba de Na^+/K^+ e bomba de Ca^{++} , respectivamente), retardando o surgimento dos desequilíbrios iônicos responsáveis pela falha na excitação elétrica, propagação do potencial de ação e habilidade contrátil do tecido muscular durante a manutenção de um esforço (30). Ademais, a TFBM também tem sido apontada como um recurso capaz de reduzir os efeitos deletérios das ERO e ERN durante a prática de um esforço físico (24), de melhorar a perfusão sanguínea tecidual (210,211) e de atenuar a sensação de dor/desconforto gerada durante o exercício (223). Reunidos, infere-se que todos esses fatores possam contribuir para alterar a dinâmica de trabalho do sistema muscular durante exercício, retardando o surgimento do fenômeno de fadiga e, por conseguinte, promovendo uma melhoria do desempenho físico em esforços de alta intensidade até à exaustão em ciclo ergômetro.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A partir desse tópico, a presente dissertação será apresentada na forma de dois artigos científicos independentes (Artigo 1 e 2). Cada artigo contém seus respectivos itens (introdução, metodologia, resultados, discussão e conclusão). O Artigo 1 pretendeu responder o objetivo específico I da dissertação, referente aos efeitos de duas doses de TFBM sobre indicadores globais, centrais e periféricos de fadiga muscular após esforço em domínio severo em cicloergômetro. Já o Artigo 2, visou responder os objetivos específicos II e III da dissertação, referentes aos efeitos de duas doses de TFBM sobre o desempenho e sobre respostas fisiológicas durante esforço em domínio severo em cicloergômetro.

5.1. ARTIGO 1.

Photobiomodulation by Led does not alter indicators of overall, central and peripheral muscle fatigue after cycling effort at severe domain

ABSTRACT

Purpose. The purpose of the present study was to determine the dose-response effect of photobiomodulation (PBM) previous a cycling effort at severe domain on neuromuscular activity during exercise and on indicators of muscle fatigue after effort. **Methods.** Fourteen recreational-trained cyclists completed four constant-load cycling efforts at severe domain. The first effort was until exhaustion (control), with no previous intervention, and the last three were performed until the same duration as the control, preceded by PBM at 260 J, or 130 J or 0 J (placebo) doses (randomized, crossover design). During all efforts, surface electromyography (EMG) of lower limb dominant muscles were recorded. Before and after the last three efforts, neuromuscular assessments consisted by maximal voluntary contractions (MVC) of knee extensors associated to peripheral nerve stimulations and EMG monitoring of *vastus lateralis* were performed to investigate overall, central and peripheral indicators of muscle fatigue. **Results.** PBM at 260 and 130 J doses provided higher values of median frequency of EMG only from *vastus lateralis* at final stages of effort, compared to placebo (treatment by time interaction, $P = 0.03$; post hoc $P \leq 0.05$). Overall, central and peripheral indicators of muscle fatigue did not shown treatment by time interaction. Relative changes between neuromuscular assessments after and before effort did not shown difference between the three treatments too. **Conclusion.** PBM applied before a cycling exercise at severe domain just attenuated muscle activity impairment of *vastus lateralis* during effort. Neither doses were effective in improve indicators of muscle fatigue after effort.

Keywords: photobiomodulation, cycling, muscle fatigue, electromyography, peripheral nerve stimulation.

INTRODUCTION

Prolonged and/or intense muscle activation leads to a temporary impairment on the ability of the neuromuscular system to produce desired levels of strength and power, usually known as muscle fatigue(1). This reversible impairment may occur at all levels of motor pathway, from the motor drive and spinal cord (central fatigue) until motor nerve and muscle (peripheral fatigue) (1,2). Peripheral muscle fatigue is generally associated to reductions in energy supply to muscle tissue and increase of metabolic by-products, whereas central muscle fatigue has been mainly related to the inhibitory effects at motor drive and spinal cord of the small diameter afferent muscle fibers sensitive to mechanical, thermal and chemic stimulus (2,3). Exercise intensity and duration determine the contributions of central and peripheral factors to muscle fatigue (4). Above anaerobic threshold, at severe domain intensity, has been demonstrated that, although both aspects are involved in muscle fatigue, peripheral impairments are greater than central in short-term efforts (~3 min), being these pattern reversed in long-term efforts (~42 min)(5,6)

Once muscle fatigue is a key factor to human physical performance (7), the discovery of potential means to counteract its deleterious effects has always been in the interest of scientific community (8). Nowadays, one of the non-pharmacological, non-invasive and legal options available is photobiomodulation (PBM) (9). PBM involves exposing tissue to non-thermal electromagnetic radiation at visible and/or invisible wavelengths through Laser and/or Led devices (10). PBM mechanisms have been essentially demonstrated with *in vitro* and animal model studies, and are based on the absorption of photons by chromophores, mainly cytochrome c oxidase (Cox) in the respiratory chain, eliciting an increase in ATP resynthesize by oxidative pathway (11,12). Secondary effects are also proposed and include an increase on blood flow and tissue oxygenation, (13,14), and attenuation of oxidative stress (10,15). Since its discovery in the 1960s, PBM has been mainly used in the clinical environment (10), however, currently it has also being used as an ergogenic resource to counteract muscle fatigue when applied prior to physical effort (9).

It is suggested that PBM treatment before an effort would mitigate muscle fatigue due to increase the energy supply to essential cell activities during exercise (i.e., ion pumps at sarcoplasm and sarcoplasmic reticulum), delay muscle-acidosis emergence, and by the better clearance of metabolic by-products that impair cell activity (9,10). Currently, a large literature has been accumulated about the effectiveness of PBM as ergogenic resource, however, the most of these studies, besides presenting conflicting findings (15–20), have referred to muscle fatigue as the end point of an effort (i.e., time to exhaustion), which could lead to misleading interpretations. Muscle fatigue is not the point of effort failure or exhaustion, rather it is a decrease in the maximal force or power that a muscle group can produce (21). In this scenario, the effectiveness of PBM has been only demonstrated in monoarticular efforts with small (22–25) and large muscles groups (26,27). Once these efforts have a little similarity with daily life exercises (i.e., running, cycling), the effectiveness of PBM on attenuate muscle fatigue in practical terms remains unknown.

Furthermore, only the surface electromyography (EMG) associated to submaximal or maximal voluntary contractions have been used by the studies that investigate more insight the effects of PBM over neuromuscular system in the fatigue scenario (23,28,29). However, although this procedure is acceptable and appropriate to investigate this phenomenon (30), the results obtained just provide overall outcomes, without specifications about peripheral and central aspects of muscle fatigue(31). In addition, another important PBM aspect is its treatment parameters. PBM has a dose-

response characteristic (32), which assumes that the absorption of high levels of energy by the target tissue will suppress its cell activities, while low doses will entail no influence (33). PBM dose are generally reported as the total energy (J) delivered to tissue area, however, once several different devices have been used (i.e., single diodes vs multi-diodes), different areas of target muscles are irradiated, therefore to discuss the findings by the total energy delivered to tissue area (i.e., J/ cm² of tissue area) could be more appropriated (32). To date, only Antonialli et al., (34) has investigated de dose-response effect of PBM over muscle fatigue, suggesting an ideal dose suggesting an ideal therapeutic window between 0.5 and of 1.5 J/cm² of tissue area.

Thus, the aim of the present study was to investigate the dose-response ergogenic effect of PBM over global, peripheral and central indicators of muscle fatigue after a constant cycling effort at severe domain, also exploring the effects over neuromuscular activity pattern of knee and hip extensor muscle during exercise. The 130 J (0.82 J/cm² of tissue area) and 260 J (1.65 J/cm² of tissue area) dosages will be used, based on the finding of a recent meta-analysis about the ideal dose to improve physical performance (total energy delivered of 60-300 J for large muscle groups)(35). Once severe domain intensity is characterized by the large participation of oxidative metabolism (36), we hypothesized that both doses of PBM will provide physiological changes on muscle tissue that will elicit a protective effect to neuromuscular system, delaying muscle activity impairments during the effort and decreasing global, central and peripheral muscle fatigue indicators levels after exercise.

METHODS

The study was conducted in a randomized, double-blind, crossover design aiming to compare the effects of two doses of PBM with the placebo (PLA) condition on neuromuscular system activity pattern during a cycling effort at the severe domain, and over central and peripheral indicators of muscle fatigue after the effort.

Participants

Eleven white skin and three brown skin healthy men (n =14) were included in the study. Participants were recreational cyclists according to guidelines to classify subject groups in sport-science research (37), without vascular disease, metabolic disorders, muscle-skeletal or joint injuries in the previous six months and had not used nutritional or pharmacological substances in this same period. Participants who were regularly absent from the trails, performed exercise, or ingested substances capable of altering neuromuscular function (i.e., caffeine, sodium bicarbonate, alcoholic drinks) at least 24 h before evaluations were excluded from the study, as well as, if presented any muscle-skeletal-joint disorder and/or initiated the use of nutritional and/or pharmacological substances during the study.

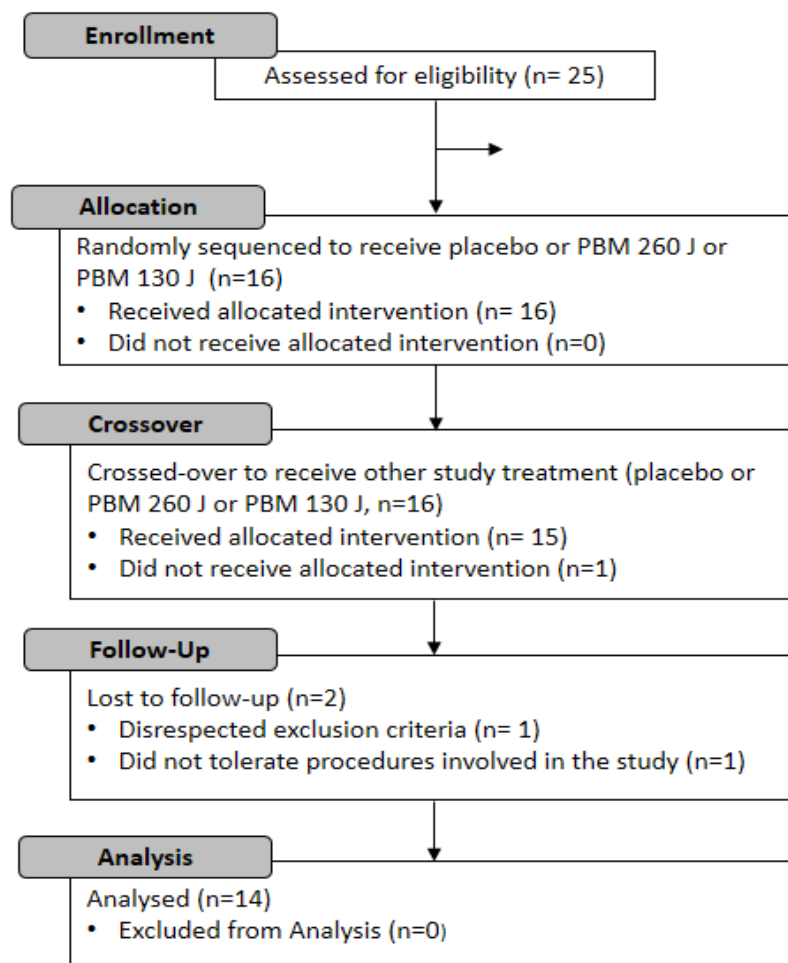
Prior to starting the study, participants were informed about the risks and benefits involved in the tests and then signed a free consent form. All experimental procedures were approved by the local Research Committee (Protocol No 2539525) and were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The flow diagram of the study is presented in Figure 1.

Experimental design

Participants underwent 6 visits at the laboratory which were performed the following procedures: Visit 1) Characterization and maximal graded exercise test (GXT) to measure maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$), the maximal aerobic power (MAP) and the respiratory compensation point (RCP); Visit 2) Constant load cycling exercise at severe

domain (CLE_{severe}) until exhaustion as a familiarization; Visit 3) CLE_{severe} until exhaustion as a control condition (CON), which the time reached (T_{lim}) was used to equalize the CLE_{severe} duration in the next visits; Visits 4, 5 and 6) CLE_{severe} isotime to CON with neuromuscular function evaluations before and immediately after CLE_{severe}, for two PBM doses (260 and 130 J) and placebo (PLA) interventions, in a crossover randomized design (Figure 1). All efforts were performed on an electromagnetic-braked cycle ergometer (Lode-Excalibur Sport, Lode BV, Groningen, Netherlands) with an individually free choice cadence remaining in a range of ± 5 rpm, between 60-100 rpm, which was defined previously the begin of the GXT. During the last four visits, CLE_{severe} was performed associated with surface electromyography (EMG) measurement, and after efforts, capillary blood samples were collected to determine peak blood lactate concentration ([LAC_{peak}]). Furthermore, a Borg CR10 scale was also used to estimate the rating of perceived muscle discomfort at lower limb (RPD) (38) after the last three efforts. All participants performed all procedures during the same period of the day, separated by a minimum interval of 48h, finalizing the study in a period of 3 to 4 weeks.

Flow-diagram



General experimental design

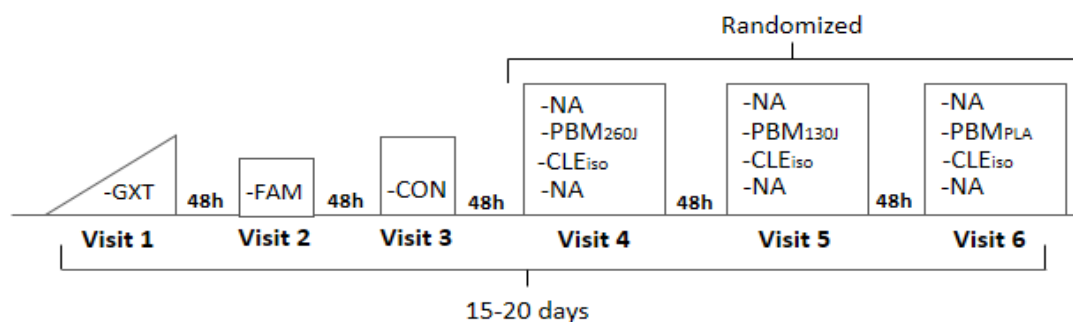


Figure 1. Flow-diagram and general experimental design of the study. GXT = graded exercise test until exhaustion, FAM = constant cycling effort until exhaustion as familiarization; CON = constant load cycling effort until exhaustion as control; NA= neuromuscular assessment associated to peripheral nerve stimulation; CLE_{iso}= constant cycling effort until duration reached in CON; PBM₂₆₀ = photobiomodulation with 260 J; PBM₁₃₀ = photobiomodulation with 130 J; PBM_{PLA} = photobiomodulation with 0 J.

Graded exercise test

The GXT was performed in a temperature controlled room ($19 \pm 1^\circ \text{C}$), and initiated at 100 W with increments of 25 W at each 2 min stage until voluntary exhaustion, defined as the inability to maintain the pre-set range cadence during 5 s (39). During GXT, respiratory responses were registered breath-by-breath using a stationary gas analyzer Quark CPET (Cosmed, Rome, Italy), previously calibrated in accordance with the manufacturers instructions. Data were smoothed every 10-points and interpolated every 1 s using software OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA). The oxygen uptake for each GXT completed stage was measured considering the average of the last 20 s of the stage. The highest $\dot{V}\text{O}_2$ average was assumed as $\dot{V}\text{O}_{2\text{peak}}$. MAP was assumed as the lowest intensity that $\dot{V}\text{O}_{2\text{peak}}$ was reached and RCP was determined from plots of ventilatory equivalent for dioxide carbon ($\dot{V}_E / \dot{V}\text{CO}_2$) vs workload, assuming RCP as the intensity equivalent to a disproportionate increase in $\dot{V}_E / \dot{V}\text{CO}_2$ (iRCP)(40).

Constant cycling effort at the severe domain

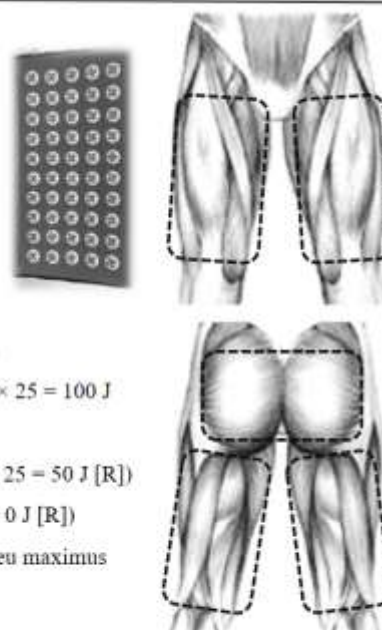
CLE_{severe} was performed at 60% of the difference between MAP and RCP ($[\Delta 60]$, severe intensity domain) calculated as equation 1 (Eq1)(6). This intensity was chosen due to the large contribution of oxidative metabolism to resynthesize ATP (36)(a physiological scenario more favorable to be influenced by PBM), and by elicit a decrease on both components of neuromuscular system (central and peripheral)(6), allowing a broader investigation of the effects of PBM. Before all CLE_{severe}, participants performed a 6 min warm-up at 60% of MAP (41), followed by 4 all-out sprints of 5 s, starting the efforts after 4 min passive rest.

$$\text{Eq.1} \quad \Delta 60\% = ([\text{MAP} - \text{RCP}] \times 0.6 + \text{RCP})$$

Photobiomodulation and placebo interventions

PBMs were performed with fixed parameters 15 min before CLE₆₀ using a multi-diode array (Table 1). PBM energy and power of irradiation were based on a recent systematic review with meta-analysis (35) regarding PBM on physical performance improvements. PLA condition consisted of fake irradiation with multi-diode array turned-off. An investigator not involved in data collection and processing performed all interventions. The orders of treatments were chosen through simple balanced randomization. In all conditions, the multi-diode array was kept in direct contact (i.e., 90° angle) with the skin surface and the participants were blindfolded and wore headphones (hearing a standard song) to avoid perceive light and/or sound signal from the device.

Table 1. Parameters of multi-diode array and PBM irradiation.

Area of multi-diode array	18 x 38 cm (684 cm ²)	
Number of LEDs	200 (25 × 4 [IR] and 25 × 4 [R])	
Area of effective irradiation	157 cm ² (50 × 3.14 cm ²)	
Wavelength	850 ± 20nm (IR) and 630 ± 10nm (R)	
Frequency	Continuous output	
Optical output (group with 4 LEDs)	80mW (IR) and 50mW(R)	
LED spot size	0.2cm ²	
Treatment time	PBM ₂₆₀ : 80s; PBM ₁₃₀ : 40s; PBM _{P_{LA}} : 60s	
Total energy delivered (muscle group)	PBM ₂₆₀ : 260J (6.4 × 25 = 160 J [IR] + 4 × 25 = 100 J [R]) PBM ₁₃₀ : 130J (3.2 × 25 = 80 J [IR] + 2 × 25 = 50 J [R]) PBM _{P_{LA}} : 0J (0 × 25 = 0 J [IR] + 0 × 25 = 0 J [R])	
Muscle groups	Quadriceps femoris; hamstrings and gluteu maximus	
Total energy delivered (related to area)	PBM ₂₆₀ : 1.65 J per cm ² of tissue area PBM ₁₃₀ : 0.82 J per cm ² of tissue area PBM _{P_{LA}} : 0 J per cm ² of tissue area	
Application mode	Devide held coupled in skin contact	

R=red; IR = infrared; PBM = photobiomodulation

Neuromuscular evaluations pre and post effort

Force data acquisition

Participants performed two 5 s knee extension maximal voluntary contractions (MVCs) with the dominant lower limb interspaced by 1 min, before and immediately (~ 2 min) after CLE. MVCs were realized in a specially designed chair maintaining knee and hip flexion at 90° (° full extension), with the thorax and waist of the participants fixed by belts. A metal rod was attached to the ankle and connected to a load cell (MKControle, São Paulo, Brazil) to ensure that the same angle torque will be repeated during contractions, avoiding peak noises in the force measurement. The load cell signal was acquired by an analog data acquisition mode (NI 6009, NI Instruments, Austin, USA) with a sample rate of 1000 Hz, and digitally filtered by a second-order Butterworth filter in MatLab R2015a. Before each test, the load cell was calibrated using known weights, and linear regression ($r^2 > 0.99$) was performed to measure MVC peak force (N, [Fpeak]), assumed as the mean of 100 ms during force plateau and used as a marker of general neuromuscular function.

Peripheral nerve stimulation (PNS)

PNS was delivered on the most sensitive site of the femoral triangle (cathode) and anterior to major trochanter of femur (anode) by the high-voltage electrical stimulator (Bioestimulador V2 400V peak-to-peak, Insight, Ribeirão Preto, Brazil) through carbon-rubber electrodes (5 × 5 cm). The optimal intensity of stimulations was determined individually before each pre effort assessments by the application of consecutive incremental doublets stimulus to the relaxed muscle (100 Hz, starting with 80 mA with 20mA increments) until reaching the force plateau (observed with 195.3 ± 25.1 mA). The

maximal electrical current achieved (mA) was assumed and supramaximal stimulation was ensured by increasing the final intensity by 20% (42)

Therefore, doublet high frequency stimulation (i.e., 100Hz) was delivered during MVCs ($\sim 2^{\text{nd}}$ s[Db100_{sup}]). With relaxed muscle, doublet high frequency (Db100), single (SING), and low frequency (i.e., 10Hz [Db10]) stimulations were respectively delivered 5, 10, and 15 s after MVC. The amplitude of the force signal of each doublet high frequency, during (i.e., Db100_{sup}) and after MVCs [Db100_F], were used to measure voluntary activation level (VA%) through equation 2 (Eq2). The Db100_F was used to measure general peripheral neuromuscular function, and the ratio between Db10 and Db100 force amplitudes (Db10_F·Db100⁻¹_F) was calculated and used as an indicator of low-frequency muscle fibers function (42,43).

$$\text{Eq.2: VA\%} = 1 - (\text{Db100}_F \times [\text{Force level at stimulation}/F_{\text{peak}}]/\text{Db100}_F) \times 100$$

Surface electromyography

EMG signal was acquired through different devices in the study. During CVMs, a New Miotool (Miotec, Porto Alegre, Brazil) with a signal frequency of 2000 Hz was used, while during the effort, the Wave Wirelles EMG device (Cometa System, Milan, Italy), also with a sample rate of 2000 Hz was utilized. The incompatibility of Wave Wireless EMG device with PNS procedure leads us to use these two devices. Before electrode placement, the skin was washed, lightly abraded and cleaned with alcohol 70% to remove hair, surface layers of dead skin, and oil. Electrodes of Ag/AgCl (Medtrace, 3.2 x 2.8 cm, Covidien, Canada) were positioned in the *vastus lateralis* (VL) (1/3 distal) of dominant lower limb to measures EMG responses during CVMs, with a ground electrode placed on the patella (44). To assess responses during the effort, electrodes were positioned in the *rectus femoris* (RF), *vastus lateralis* (VL), *biceps femoris* (BF) and *gluteus maximus* (GM) of dominant lower limb according to Surface Electromyography for No-Invasive Assessment of Muscles (SENIAM) (45) recommendations.

The EMG signal acquired during CVMs was posteriorly band-pass filtered (20-500Hz), and the RMS (RMS_{MVC}) and MdF (MdF_{MVC}) of 1 s of force plateau were calculated and used as indicators general neuromuscular discharge magnitude and rate, respectively (31). The peak-to-peak maximal amplitude and duration evoked by SING stimulus (M-wave, [Mw_{amp}], [Mw_{dur}]) were calculated and used as an indicator of peripheral neural system conductibility function, and the ratio between RMS_{MVC} and Mw (RMS_{MVC}·Mw_{amp}⁻¹) were calculated and used as an indicator of central activation function (31). The EMG signal acquired during effort was also posteriorly band-pass filtered (20-500 Hz) and the average root mean square (RMS) and median frequency (MF) for 4 time bands (0-25%, 25-50%, 50-75%, and 75-100%) were calculated in an isotime design between the last three visits, based on the time to exhaustion reached in CON. Software MatLab R2015a was also used to perform this analysis and the values are presented normalized by the highest ones observed in CON.

Blood sample collection and analysis ´p

Blood samples from ear lobe (25 µL) were collected 5 and 7 min after effort, through heparinized capillaries, immediately deposited into microtubes containing 50 µL of sodium fluoride at 1%, and posteriorly analyzed in an electrochemical analyzer YSI 2900 (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA) aiming to measure peak blood lactate concentration after effort ([LAC_{peak}]), with results being expressed in mmol·L⁻¹.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the software package SPSS version 20.0 (IBM Corp., New York, USA). Data are presented as mean and standard deviations (mean $\pm$ SD) and 95% confidence interval (CI95%). A two-way ANOVA was used to both compare EMG responses during CLE_{severe} between conditions (i.e., PBM₂₆₀, PBM₁₃₀, and PBM_{PLA} [factor condition]), within-conditions (i.e., 25%, 50%, 75%, and 100% of the Tlim at CLE_{severe}[factor time]), and the interaction between the factors (condition $\times$ time), as well as, the absolute neuromuscular responses during MVC (mechanical and EMG) between conditions, within-conditions (i.e., before and after CLE_{severe}[factor time]), and the interaction between the factors (condition $\times$ time). In order to compare the relative changes ($\Delta\%$) of neuromuscular mechanical and EMG responses, [LAC⁻_{peak}], and RPD between conditions, a one-way repeated measure ANOVA was used. In all cases, the Mauchly's test of sphericity was applied and Greenhouse-Geisser Epsilon correction (p and F values) were used when the sphericity criteria were not met. When necessary, the analyses were completed with SIDAK *post hoc*. The significance level of 5% was assumed in all cases. Cohen's effect sizes (Cohen's d) were paired calculated (i.e., PBM₂₆₀ $\times$ PBM_{PLA}, and PBM₁₃₀ $\times$ PBM_{PLA}) to the relative changes ($\Delta\%$) of neuromuscular mechanical and EMG responses based on means and standard deviations. The magnitude of the effect size was interpreted as: *trivial* = <0.20 ; *small* = $0.21-0.5$; *moderate* = $0.51-0.79$; *large* = $0.80-1.29$; *very large* = >1.30 . In addition, a Pearson correlation test was used to explore associations among the variables investigated in the present study.

Results

The $\dot{V}O_{2peak}$ reached in the GXT was 48.86 ± 6.69 (44.97 to 52.72) mL $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ min⁻¹. The MAP and iRCP were 3.70 ± 0.52 (3.40 to 3.99) W $\cdot$ kg⁻¹ and 2.96 ± 0.52 (2.68 to 3.25) W $\cdot$ kg⁻¹, respectively. The intensity of CLE_{severe} was 3.41 ± 0.51 (3.10 to 3.68) W $\cdot$ kg⁻¹, which represents 91.9 ± 2.2 (90.6 to 93.2) % of MAP and the Tlim reached in CON was 634.14 ± 177.77 (531.49 to 736.78) s.

CLE_{EMG} responses of RMS and MdF during the time bands of CLE_{severe}, normalized by the highest values reached in CON, are presented in Figure 1. No significant interactions were observed to RMS values of *rectus femoris* ($P = 0.97$), *vastus lateralis* ($P = 0.97$), *biceps femoris* ($P = 0.51$), and *gluteus maximus* ($P = 0.65$) muscles. However, a time effect ($P < 0.01$) was observed in all muscles, evidencing higher values of RMS in the 75-100% time band, compared to the others (post hoc $P < 0.01$). Similarly to RMS, no interactions were observed to MdF values of *rectus femoris* ($P = 0.60$), *biceps femoris* ($P = 0.26$) and *gluteus maximus* ($P = 0.4$) muscles. However, for *vastus lateralis* muscle a treatment $\times$ time (i.e., interaction) effect was observed in the 50-75% time band of CLE_{severe} with PBM₂₆₀ and PBM₁₃₀ presenting 56.11% and 52.48% higher values of MdF than PBM_{PLA} (55.01 Hz). Besides, a time effect ($P < 0.01$) for all muscle was observed, evidencing smaller values of MdF in the 75-100% time band, compared to the others (post hoc $P < 0.01$).

Mechanical responses of neuromuscular assessments before and after CLE_{severe} are presented in Table 2. All conditions presented decrease of F_{peak} comparing before and after moments (time effect, $P < 0.01$), but with no interaction effect ($P = 0.13$) and with no differences in $\Delta\%$ changes ($P = 0.16$) between conditions. Decrements of Db100_F (time effect, $P < 0.01$) after CLE_{severe} and in Db10_F:Db100⁻¹_F ratio ($P < 0.01$), were also observed, with no interaction effects for both markers, and with no differences in $\Delta\%$ changes (Db100_F: $P = 0.17$; Db10_F:Db100⁻¹_F: $P = 0.64$). Besides, all conditions shown reductions in VA% comparing after and before moments ($P < 0.01$), with no interaction effect ($P = 0.18$) and differences between $\Delta\%$ changes ($P = 0.19$). Regarding Cohen's

ES, the higher effects observed on mechanical responses were with $PBM_{260} \times PBM_{PLA}$ over $\Delta\%$ changes of both F_{peak} and $VA\%$ ($d = 0.70$, moderate effects, less reduction after PBM_{260} condition), and $Db100_F$ ($d = 0.5$, small effect)

Regarding EMG responses of neuromuscular assessments (Table 2), a reduction in RMS_{MVC} ($P < 0.01$) comparing after and before moments were noticed with CLE_{severe} not influencing MdF_{MVC} , ($P = 0.32$). No interactions were observed to RMS_{MVC} ($P = 0.21$), as well as differences in $\Delta\%$ changes ($P = 0.13$) between conditions. Mw_{amp} not presented alterations due to CLE_{severe} ($P = 0.42$), as well as $RMS \cdot Mw_{ap}^{-1}$ ($P = 0.08$). In addition, Mw_{dur} presented a reduction comparing after and before moment ($P < 0.01$), with no interaction effect ($P = 0.90$) and difference in $\Delta\%$ changes ($P = 0.60$) between conditions. Concerning Cohen's ES, the higher effects observed on EMG responses were with $PBM_{260} \times PBM_{PLA}$ over Mw_{dur} ($d = 0.54$, small effect, less reduction after PBM_{260} condition).

In addition, were not found significant differences between conditions to peak of blood lactate concentration after effort ($P = 0.10$), and RPD ($P = 0.21$). Significant but weak correlation between RPD and decrements on $Db10_F \cdot Db100^{-1}_F$ was found ($p = 0.01$, $r = -0.41$), as well as between peak of blood lactate concentration after effort and decrements on F_{peak} ($p = 0.02$, $r = -0.35$).

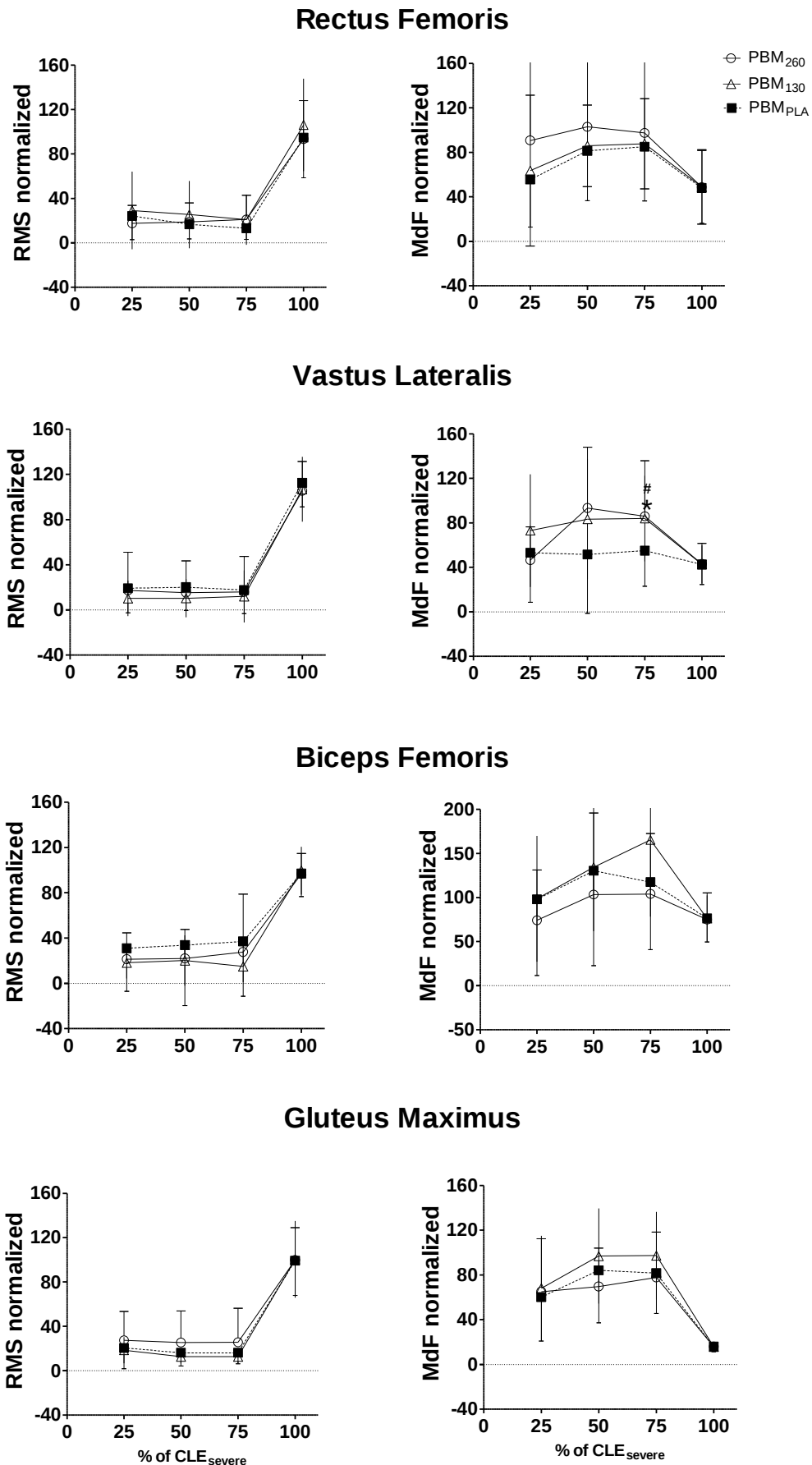


Figure 2. Surface electromyographic responses measured during constant cycling effort at severe domain, normalized by the highest values observed in CON. * = $p < 0.05$, PBM₂₆₀ $\times$ PBM_{PLA} (ANOVA two-way, time $\times$ condition effect). # = $p < 0.05$, PBM₁₃₀ $\times$ PBM_{PLA} (ANOVA two-way, time $\times$ condition effect). RMS = root mean square; MdF = median Frequency; % of CLE = percentage of time to exhaustion reached in CON condition. PBM₂₆₀ = PBM with 260 J dose; PBM₁₃₀ = PBM with 130 J dose; PBM_{PLA} = PBM with 0 J dose.

Table 2. Mechanical and EMG responses of peripheral nerve stimulation of femoral nerve at rest and during MVC before and after constant load cycling effort at the severe domain.

Global fatigue indicators	PBM ₂₆₀			PBM ₁₃₀			PBM _{PLA}		
	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%
F _{peak} (N)	638.69 ± 155.46 (548.92 to 728.44)	576.24 ± 157.31* (485.41 to 667.07)	-10.05±7.6 (-14.45 to -5.67)	648.49 ± 162.72 (554.54 to 742.45)	547.40 ± 143.74* (464.40 to 630.39)	-14.97 ± 11.55 (-21.64 to -8.29)	681.79 ± 173.94 (581.40 to 782.27)	567.5 ± 163.26* (473.20 to 661.74)	-16.5 ± 10.8 (-22.75 to -10.28)
RMS _{MVC} (mV)	434.54 ± 183.16 (311.5 to 557.59)	348.84 ± 210.49* (207.43 to 490.25)	-21.7 ± 33.5 (-44.15 to 0.79)	520.21 ± 127.19 (434.76 to 605.66)	436.737 ± 120.45* (355.80 to 517.65)	-16.1 ± 11.8 (-24.03 to -8.22)	450.95 ± 180.28 (329.83 to 572.06)	429.63 ± 175.28* (311.87 to 547.39)	-3.2 ± 16.6 (-14.36 to 7.94)
MdF _{MVC} (Hz)	84.18 ± 13.94 (74.81 to 93.55)	78.31 ± 14.09 (68.84 to 87.77)	-5.11 ± 21.18 (-19.34 to 9.11)	76.55 ± 16.76 (65.29 to 87.81)	77.4 ± 14.8 (67.42 to 87.37)	4.88 ± 29.09 (-14.66 to 24.42)	120.86 ± 157.18 (15.26 to 226.46)	115.17 ± 152 (13.05 to 217.29)	-3.16 ± 26.58 (-21.02 to 14.69)
Peripheral fatigue indicators	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%
	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%
Db100 _F (N)	230.70 ± 89.03 (179.29 to 282.11)	201.26 ± 77.98* (156.23 to 246.28)	-12.29 ± 10.2 (-18.18 to -6.39)	248.9 ± 51.82 (218.98 to 278.82)	197.97 ± 60.17* (163.22 to 232.71)	-20.8 ± 15.8 (-30.02 to -11.76)	276.11 ± 73.21 (233.83 to 318.38)	224.5 ± 63.95* (187.59 to 261.45)	-17.9 ± 12.2 (-24.98 to -19.85)
Db10 _F ·Db100 ⁻¹ _F (N)	0.72 ± 0.11 (0.64 to 0.78)	0.51 ± 0.12 (0.43 to 0.57)	-29.1 ± 13.7 (-37.01 to -21.25)	0.69 ± 0.15 (0.6 to 0.78)	0.47 ± 0.18 (0.36 to 0.58)	-32.59 ± 17.40 (-42.67 to -22.57)	0.74 ± 0.16 (0.65 to 0.83)	0.53 ± 0.14 (0.44 to 0.61)	-28.50 ± 1.80 (-36.50 to -20.51)
Mw _{amp} (mV)	14.42 ± 1.74 (12.97 to 15.88)	13.73 ± 1.61* (12.38 to 15.08)	-4.41 ± 6.09 (-9.50 to 0.68)	13.21 ± 3.05 (10.66 to 15.76)	12.75 ± 2.77* (10.42 to 15.07)	-2.68 ± 9.57 (-10.68 to 5.31)	13.52 ± 3.10 (10.92 to 16.12)	14.12 ± 3.71* (11.01 to 17.23)	4.27 ± 11.88 (-5.65 to 14.20)
Mw _{dur} (ms)	16.25 ± 7.44 (10.03-22.47)	13.75 ± 5.17 (9.42-18.07)	-8.37 ± 23.68 (-28.17 to 11.42)	16.25 ± 5.17 (11.92 to 20.57)	12.5 ± 4.62 (8.63 to 16.37)	-18.75 ± 25.87 (-40.38 to 2.88)	13.75 ± 5.17 (9.42 to 18.07)	10.0 ± 5.34 (5.53 to 14.46)	-25 ± 37.79 (-56.59 to 6.59)
Central fatigue Indicators	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%
	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%	Before	After	Δ%
AV (%)	92.56 ± 5.29 (89.00 to 96.12)	92.19 ± 4.22* (89.34 to 95.02)	-0.27 ± 4.1 (-3.05 to 2.50)	95.22 ± 4.08 (92.47 to 97.07)	92.11 ± 3.63* (89.66 to 94.54)	-3.22 ± 3.10 (-5.30 to -1.12)	95.39 ± 4.46 (92.39 to 98.39)	92.46 ± 5.05* (89.06 to 95.85)	-3.04 ± 3.76 (-5.57 to -0.52)
RMS·Mw _{amp} ⁻¹ (mV)	0.03 ± 0.01 (0.02 to 0.43)	0.03 ± 0.01 (0.02 to 0.04)	-1.49 ± 16.53 (-15.31 to 12.32)	0.04 ± 0.01 (0.26 to 0.46)	0.03 ± 0.01 (0.2 to 0.48)	-12.02 ± 15.49 (-24.97 to .93)	0.03 ± 0.01 (0.24 to 0.41)	0.03 ± 0.01 (0.24 to 0.36)	-5.77 ± 15.45 (-18.69 to 7.14)

Values are expressed in Mean ± SD (CI95%). * = p < 0.05 comparing after to before moments. F_{peak} = MVC peak force; Db100_F= mechanical response evoked by femural motor nerve stimulation at 100Hz; Db10_F = mechanical response evoked by femural motor nerve stimulation at 10 Hz; VA = voluntary activation; RMS_{MVC}= root mean square of vastus lateralis muscle during MVC; MdF_{MVC} = Median frequency of vastus lateralis muscle during MVC; Mw_{amp} = maximal amplitude of m-wave; Mw_{dur} = duration of m-wave. PBM₂₆₀ = PBM with 260 J dose; PBM₁₃₀ = PBM with 130 J dose; PBM_{PLA} = PBM with 0 J dose.

DISCUSSION

The purpose of the present study was to investigate the dose-response effect of PBM on indicators of central and peripheral muscle fatigue elicited by a cycling effort at severe domain, also exploring muscle activation pattern during effort. The results of the present study demonstrated that both doses of PBM (260 J or 0.38 J/cm² of tissue area and 130 J or 0.19 J/cm² of tissue area) just attenuate the impairment of *vastus lateralis* activity during exercise, as evidenced by improvements on MdF of the EMG signal at the final stages of CLE_{severe} (time band of 50-75% of time to exhaustion) in comparison to placebo. Furthermore, PBM not influence muscle fatigue immediately after effort, with no significant differences on the indicators of global, central and peripheral muscle fatigue between the three conditions (i.e., PBM₂₆₀, PBM₁₃₀, PBM_{PLA}).

During cycling efforts at intensities above 80% of MAP, has been demonstrated that hip extensor muscles providing the major contribution to power output maintenance, mainly at the final stages of efforts (> 75% of time to exhaustion), when knee extensor muscles are fatigued (46,47). Lanferdini et al.,(2017), demonstrated that PBM at 135 J dosage (9 irradiations points of 15 J each) applied on knee extensor muscles (*rectus femoris*, *vastus lateralis*, and *vastus medialis*) was capable of mitigate muscle activity impairment during effort at MAP intensity until exhaustion, evidenced by higher values of MdF at high bands frequency of EMG signal from these muscles in the end of the test. Although the major contribution of hip extensor muscles to power maintenance in this intensity, the authors concluded that the PBM influence over the recruitment of high-twitch motor units in knee extensor was determinant to the improvement of performance also observed in this study.

The authors not conducted physiological measures direct related do PBM cell mechanisms, however, they associated this finding to the increase on microcirculation and tissue oxygenation, which has been demonstrated in animal models (49) and human studies (49). The present study also not promoted any PBM cell-mechanism investigation and based on the literature accumulated so far, we hypothesize that the protective effect of PBM in *vastus lateralis* activity during effort also occurred due to this changes on muscle tissue.

Regarding to neuromuscular system activity after effort, the present study observed that CLE_{severe} promoted muscle fatigue (noticed by the decreases on F_{peak} and RMS_{MVC}), associated with central (evidenced by the reduction in VA%) and peripheral (decreases on Db100_F) impairments to neuromuscular system, also resulting in specific slow-twitch muscle fatigue (reduction on Db10_F · Db100⁻¹_F) and impairments on propagation of electrical stimuli to muscle by motor nerve (increase on Mw_{dur}) (4,31). To date, the present study is the first investigation that explored PBM effects on central and peripheral aspects of muscle fatigue after the effort. Previously studies involving PBM effects on muscle fatigue after effort were conducted only assessing global muscle fatigue indicators (maximal force production). Baroni et al.,(26) using PBM at 125.1 J dose on *quadriceps femoris* (3 irradiation point, 41.7 J each) previously muscle fatigue protocol of knee extensors (30 maximal isokinetic contractions at 180°·s⁻¹), observed higher torque values after effort (4%) when PBM was used, comparing to the placebo condition. In another investigations, Baroni et al., (27) and Antonialli et al., (34), also observed that PBM (180 J, 6 point of irradiation, 30 J each) was effective in attenuate strength loss after an isokinetic eccentric protocol to *quadriceps femoris*.

The total dose delivered to target muscles in the present study were based on the findings of recent meta-analysis that investigated PBM ergogenic effects over neuromuscular system (60 – 300 J when large muscle groups aimed to be treated) (35). However, once the area irradiated over the target tissue seems to be essential to PBM provide effects over cell activities (50,51), just deliver this energy on randomly selected spots on target tissue without attempting to treat the entire tissue may cause inappropriate dosing(50). The scientific community, trying better standardizing PBM dose parameters, have been usually reporting the dose of PBM as energy density (J/cm^2). However, even this assumption might be causing misleading interpretation that could be misrepresenting the results of the studies about PBM ergogenic effects.

As described by Hode and Tunér (32) in a letter to the editor, the energy density (J/cm^2) should be considered as the average energy delivered through the skin surface covering the target tissue (J/cm^2 of irradiated area), instead of the direct illuminated area by the device as related in the most of the studies. For example, if we consider a spot size of 0.02 cm^2 to deliver 6 J of energy, an energy density of $300 \text{ J}/\text{cm}^2$ will be applied over the illuminated area. However, if we consider the point of irradiation surrounded by a surface of 1 cm^2 , using the same device in the same parameters, the average dose delivered to this area will be only $6 \text{ J}/\text{cm}^2$. This example demonstrated that even with the same dose in mind, the rationale used by different applicators could change the real amount of energy delivered to a target tissue, which may explain the large number of different results in this area.

Among Baroni et al.,(26,27) and Antonialli et al., (34) studies, just the last authors reported the aperture area of the PBM device used (20 cm^2), allowing an inference about the size of the area of irradiated tissue (6 points, total of 120 cm^2 of irradiated area), and the total of energy delivered to this area (180 J by 120 cm^2 , elicit a $1.5 \text{ J}/\text{cm}^2$ of tissue area dosage).. Efforts at severe domain intensity are marked by the accumulation of metabolic by-products involved in muscle fatigue, as adenosine diphosphate (ADP), inorganic phosphate (Pi), and hydrogen protons (H^+)(6). Especially in cycling, which venous return is reduced comparing to others exercises(52), this metabolic perturbation probably elicited higher peripheral and central neuromuscular impairments than isolated contractions efforts. For a brief comparison, in the Baroni et al.,(26) study, the total work performed by participants in the fatigue protocol was $\sim 4.2 \text{ kJ}$. In the present study, considering the mean cadence, power and duration in which participants performed $\text{CLE}_{\text{severe}}$ (~ 60 rotation per minute, $\sim 262 \text{ W}$, and $\sim 635 \text{ s}$, respectively), a total of $\sim 167 \text{ kJ}$ of work was performed.

It is important to emphasize that, despite an ideal dose to PBM provide ergogenic effects in large muscle groups has been suggested (35), this therapeutic window just represent 75% of the doses with positive results. As evidenced by Hemming et al., (53), PBM delivered by 6 points of irradiations over *quadriceps femoris* (28.2 cm^2 each, total of 169.2 cm^2 irradiated area) at dosages of 522 J ($3.08 \text{ J}/\text{cm}^2$ of tissue area) and 1044 J ($6.16 \text{ J}/\text{cm}^2$ of tissue area), provided a positive influence on neuromuscular system, improving time to exhaustion in an isolated knee flexion-extension fatigue protocol. Therefore, during efforts at severe intensity domain in which observes a large impairment

in neuromuscular system, this type of large PBM dosages could be necessary to elicit an ergogenic effects further mitigating muscle fatigue.

Besides, Rossato et al.(54) observed that PBM at 270 J (0.99 J/cm² of tissue area), applied on *quadriceps femoris* 6h + immediately previously isokinetic fatigue protocol (45 flexion-extension concentric at 180°·s⁻¹), promoted fewer torque decrements on peak isokinetic force of knee extensors, comparing to control, placebo and PBM applied immediately before fatigue protocol. This finding support another discussed treatment aspect of PBM, its time-response characteristic that has already previously demonstrated in an animal model study (11) and. The time-response aspect of PBM suggest the need of a 6-h time window between the treatment and the effort to further notice high influences of PBM over physiological systems(11). This treatment aspect was not investigate in the present study and could be associated to no significant influences of PBM over muscle fatigue indicators after effort.

Although PBM not promoted significant influences on relative changes ($\Delta\%$) of mechanical and EMG responses, Cohen's ES demonstrated a moderate and small non-significant effects of PBM at 260 J comparing to PLA in improve some indicators of muscle fatigue after effort. These findings may have a clinical importance, especially to specific populations as elderly and non-healthy subjects (i.e., Parkinson, multiple sclerosis, among others) with basal muscle fatigue established. In addition, PBM also not promoted changes on $[LAC^-_{peak}]$ and RPD after the effort. Although the absence of a direct link between lactate and muscle fatigue, the concentration of this molecule on blood is generally used to measure the level of work performed by the neuromuscular system, especially on high-intensity efforts, which participation of glycolysis is pronounced(55). As previously discussed, PBM in the used parameters seems to provide just a slight protective effect on neuromuscular system, therefore, was expected that these physiological and psychophysical associated to neuromuscular system activity levels also remained not influenced. Interestingly, a significant weak correlation between RPD and decrements on $Db10_F \cdot Db100^{-1}_F$ were found ($p = 0.01$, $r = -0.41$), probably due to influence that metabolic by-products have in these both variables (2,38), as well as between $[LAC^-_{peak}]$ and decrements on F_{peak} ($p = 0.02$, $r = -0.35$), suggesting that the higher $[LAC^-_{peak}]$ value, the greater the loss of strength (greater acidosis was generated by greater glycolysis pathway activity).

CONCLUSION

Thus, according to the overall findings of the present study, PBM (130 J and 260 J) promoted a slight protective effect against exercise-induced muscle impairment of *vastus lateralis* muscle at the final stages of CLE_{severe}. However, PBM not improve overall, central and peripheral muscle fatigue indicators after effort. Future studies involving these populations and exploring other PBM aspects (as its time-response characteristic and total dose delivered by tissue area) are need for better determine the effects of PBM on muscle fatigue in practical terms.

LIMITATIONS

This study has some limitations. We were unable to perform measures directly related to PBM cell mechanisms, as the increase on cytochrome *c* oxidase activity. Other assessments as the Doppler ultrasonography of lower limb blood vessels to investigate changes on microcirculation, measures of nitrite concentration to explore nitric oxide bioavailability on blood, and measures of molecules related to oxidative stress could not be conducted in the present study too. Moreover, the time-response aspect of PBM, which has been highlighted as a key factor to its effectiveness, was not addressed in the present

study. Thus, these physiological changes, supposed to be influenced by PBM and that have a strict relation with muscle fatigue, need to be explored in future studies, as well as PBM time-response characteristic, to further provide a better understanding about PBM effects over muscle tissue.

REFERENCES

1. Enoka RM, Stuart DG. Neurobiology of muscle fatigue. *J Appl Physiol*. 1992;72(5):1631–48.
2. Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev* [Internet]. 2001;81(4):1725–89. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/81/4/1725.full.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581501>
3. Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* [Internet]. 2008;88(1):287–332. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/88/1/287.short>
4. Millet GY, Lepers R. Alterations of Neuromuscular Function after Prolonged Running, Cycling and Skiing Exercises. *Sport Med*. 2004;34(2):105–16.
5. Black MI, Jones AM, Blackwell JR, Bailey SJ, Wylie LJ, McDonagh STJ, et al. Muscle metabolic and neuromuscular determinants of fatigue during cycling in different exercise intensity domains. *J Appl Physiol* [Internet]. 2017;122(3):446–59. Available from: <http://jap.physiology.org/lookup/doi/10.1152/japplphysiol.00942.2016>
6. Thomas K, Elmeua M, Howatson G, Goodall S. Intensity-Dependent Contribution of Neuromuscular Fatigue after Constant-Load Cycling. Vol. 48, *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2016. 1751-1760 p.
7. Enoka RM, Duchateau J. Translating Fatigue to Human Performance. 2016.
8. Wan JJ, Qin Z, Wang PY, Sun Y, Liu X. Muscle fatigue: General understanding and treatment. *Exp Mol Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;49(10):e384-11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2017.194>
9. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: Performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med*. 2012;1(4):267–86.
10. Chung H, Dai T, Sharma S, Huang Y, Carroll J, Hamblin M. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516–33.
11. Ferraresi C, de Sousa MVP, Huang YY, Bagnato VS, Parizotto NA, Hamblin MR. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci*. 2015;30(4):1259–67.
12. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1999;49(1):1–17.
13. Wang X, Tian F, Soni SS, Gonzalez-Lima F, Liu H. Interplay between up-regulation of cytochrome-c-oxidase and hemoglobin oxygenation induced by near-infrared laser. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6(August):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep30540>
14. Lohr NL, Keszler A, Pratt P, Bienengraber M, Warltier DC, Hogg N. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: Potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;47(2):256–63. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.009>
15. Marchi T De, Cesar E, Leal P, Lopes-martins RÁB, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running : effects on exercise performance , skeletal muscle status , and oxidative stress. 2012;231–6.
 16. Miranda EF, Vanin AA, Tomazoni SS, Dos Santos Grandinetti V, De Paiva PRV, Dos Santos Monteiro Machado C, et al. Using pre-exercise photobiomodulation therapy combining super-pulsed lasers and light-emitting diodes to improve performance in progressive cardiopulmonary exercise tests. *J Athl Train*. 2016;51(2):129–35.
 17. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Dalan F, Ferrari M, Sbabo FM, Generosi RA, et al. Effect of 655-nm Low-Level Laser Therapy on Exercise-Induced Skeletal Muscle Fatigue in Humans. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2008;26(5):419–24. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2007.2160>
 18. Dos Reis FA, da Silva BAK, Laraia EMS, de Melo RM, Silva PH, Leal-Junior ECP, et al. Effects of pre- or post-exercise low-level laser therapy (830 nm) on skeletal muscle fatigue and biochemical markers of recovery in humans: double-blind placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2014;32(2):106–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24456143>
 19. Malta EDS, De Poli RAB, Brisola GMP, Milioni F, Miyagi WE, Machado FA, et al. Acute LED irradiation does not change the anaerobic capacity and time to exhaustion during a high-intensity running effort: a double-blind, crossover, and placebo-controlled study: Effects of LED irradiation on anaerobic capacity and performance in runnin. *Lasers Med Sci* [Internet]. *Lasers in Medical Science*; 2016;31(7):1473–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2011-y>
 20. Denis R, O’Brien C, Delahunt E. The effects of light emitting diode therapy following high intensity exercise. *Phys Ther Sport* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;14(2):110–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ptsp.2012.03.014>
 21. Enoka RM, Duchateau J. Muscle fatigue : what , why and how it influences muscle function. 2008;1:11–23.
 22. Borsa PA, Larkin KA, True JM. Does phototherapy enhance skeletal muscle contractile function and postexercise recovery? A systematic review. *J Athl Train*. 2013;48(1):57–67.
 23. Rossato M, Dellagrana RA, Lanferdini FJ, Sakugawa RL, Lazzari CD, Baroni BM, et al. Effect of pre-exercise phototherapy applied with different cluster probe sizes on elbow flexor muscle fatigue. *Lasers Med Sci* [Internet]. *Lasers in Medical Science*; 2016;31(6):1237–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-1973-0>
 24. De Almeida P, Lopes-Martins RÁB, De Marchi T, Tomazoni SS, Albertini R, Corrêa JCF, 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*. 2012;27(2):453–8.
 25. de Souza CG, Borges DT, de Brito Macedo L, Brasileiro JS. Low-level laser therapy reduces the fatigue index in the ankle plantar flexors of healthy subjects. *Lasers Med Sci* [Internet]. *Lasers in Medical Science*; 2016;31(9):1949–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2074-9>
 26. Baroni BM, Leal Junior ECP, Geremia JM, Diefenthaler F, Vaz MA. Effect of light-emitting diodes therapy (LEDT) on knee extensor muscle fatigue. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(5):653–8.

27. Baroni BM, Leal Junior ECP, De Marchi T, Lopes AL, Salvador M, Vaz MA. Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110(4):789–96.
28. Toma RL, Tucci HT, Antunes HKM, Pedroni CR, De Oliveira AS, Buck I, et al. Effect of 808 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in elderly women. *Lasers Med Sci.* 2013;28(5):1375–82.
29. Ferraresi C, De Brito Oliveira T, De Oliveira Zafalon L, De Menezes Reiff RB, Baldissera V, De Andrade Perez SE, et al. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. *Lasers Med Sci.* 2011;26(3):349–58.
30. Cifrek M, Medved V, Tonković S, Ostojić S. Surface EMG based muscle fatigue evaluation in biomechanics. *Clin Biomech.* 2009;24(4):327–40.
31. Millet GY, Martin V, Martin A, Vergès S. Electrical stimulation for testing neuromuscular function: From sport to pathology. *Eur J Appl Physiol.* 2011;111(10):2489–500.
32. Hode L, Tunér J. Wrong parameters can give just any results. *Lasers Surg Med.* 2006;38(4):343.
33. Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response [Internet].* 2011;9(4):602–18. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3315174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Antonialli FC, De Marchi T, Tomazoni SS, Vanin AA, dos Santos Grandinetti V, de Paiva PRV, 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.* 2014;29(6):1967–76.
35. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD, Costa LOP, Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci. Lasers in Medical Science;* 2018;33(1):181–214.
36. Pooles DC, Ward SA, Gardner GW, Whipp BJ. Metabolic and respiratory profile of the upper limit for prolonged exercise in man. *Ergonomics.* 1988;31(9):1265–79.
37. Pauw K De, Roelands B, Cheung SS, Geus B De. Guidelines to Classify Subject Groups in Sport-Science Research. 2013;(September 2014).
38. Borg G. Psychophysical scaling with applications in physical work and the perception of exertion. In: *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health.* 1990. p. 55–8.
39. Miyagi WE, Zagatto AM. Maximal Oxygen Uptake cannot be Determined in the Incremental Phase of The Lactate Minimum Test on a Cycle Ergometer. 2015;(June):372–8.
40. Binder RK, Wonisch M, Corra U, Cohen-Solal A, Vanhees L, Saner H, et al. Methodological approach to the first and second lactate threshold in incremental cardiopulmonary exercise testing. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil [Internet].* 2008;15(6):726–34. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1097/HJR.0b013e328304fed4>
41. Bishop D. Warm up II: Performance changes following active warm up and how to structure the warm up. *Sports Medicine.* 2003.
42. Milioni F, Vieira LHP, Barbieri RA, Zagatto AM, Nordsborg NB, Barbieri FA, et

- al. Futsal Match-Related Fatigue Affects Running Performance and Neuromuscular Parameters but Not Finishing Kick Speed or Accuracy. *Front Physiol* [Internet]. 2016;7(November):518. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27872598>
43. Neyroud D, Vallotton A, Millet GY, Kayser B, Place N. The effect of muscle fatigue on stimulus intensity requirements for central and peripheral fatigue quantification. *Eur J Appl Physiol*. 2014;114(1):205–15.
44. Miura N, Watanabe T. Potential of M-Wave Elicited by Double Pulse for Muscle Fatigue Evaluation in Intermittent Muscle Activation by Functional Electrical Stimulation for Motor Rehabilitation. *J Med Eng*. 2016;2016:1–12.
45. Hermens HJ, Freriks B, Disselhorst-Klug C, Rau G. Development of recommendations for SEMG sensors and sensor placement procedures. *J Electromyogr Kinesiol*. 2000;10(5):361–74.
46. Ando R, Kondo S, Katayama K, Ishida K, Akima H. Neuromuscular activation of the knee and hip extensor muscles during high-intensity interval and moderate-intensity constant cycling. *J Electromyogr Kinesiol* [Internet]. Elsevier; 2019;44(November 2018):64–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jelekin.2018.11.012>
47. Dorel S, Drouet JM, Couturier A, Champoux Y, Hug F. Changes of pedaling technique and muscle coordination during an exhaustive exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(6):1277–86.
48. Lanferdini FJ, Bini RR, Baroni BM, Klein KD, Carpes FP, Vaz MA. Low-Level Laser Therapy Improves Performance and Reduces Fatigue in Competitive Cyclists. *Int J Sports Physiol Perform* [Internet]. 2017;1–27. Available from: <http://journals.humankinetics.com/doi/10.1123/ijsp.2016-0187>
49. Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med*. 2000;27(5):427–37.
50. Enwemeka CS. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(3):387–93.
51. Ferraresi C, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? *J Biophotonics*. 2016;27(September).
52. Millet GP, Vleck VE, Bentley DJ. Physiological Differences Between Cycling and Running. *Sport Med*. 2009;39(3):179–206.
53. Hemmings TJ, Kendall KL, Dobson JL. Identifying dosage effect of light-emitting diode therapy on muscular fatigue in quadriceps. *J Strength Cond Res*. 2017;
54. Rossato M, Dellagrana RA, Sakugawa RL, Lazzari CD, Baroni BM, Diefenthaler F. Time Response of Photobiomodulation Therapy on Muscular Fatigue in Humans. *J Strength Cond Res* [Internet]. 2018;1. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00124278-9000000000-95517>
55. Finsterer J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. *BMC Musculoskeletal Disorders*; 2012;13(1):1. Available from: *BMC Musculoskeletal Disorders*

5.2 ARTIGO 2

Photobiomodulation by Led does not improve time to exhaustion in a constant-load cycling exercise at severe domain and not changed physiological responses during the effort.

ABSTRACT

Purpose. The purpose of the present study was to investigate the effect of photobiomodulation (PBM) previous a long-term cycling effort at severe domain on time to exhaustion, neuromuscular, metabolic, acid-base and respiratory responses during exercise. **Methods.** Thirteen, recreational-trained cyclists ($\dot{V}O_{2peak}$, $48.10 \pm 4.81 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) completed three constant-load cycling efforts at severe domain ($\Delta 60\%$) until exhaustion, preceded by PBM at 260 J, or 130 J or 0 J (placebo) doses (randomized, crossover design). During efforts, surface electromyography (EMG) of lower limb dominant muscles and blood lactated concentrations were recorded and analyzed in four-time bands (0-25, 25-50, 50-75, and 75- 100%), respiratory gas exchange, and capillary gasometry responses were recorded and analyzed in to time bands (i.e., 50% and 100%), and contribution of oxidative metabolism (Eox) throughout the effort was also measured. All analysis were performed in an isotime design according to shorter time to exhaustion reached among the three conditions. **Results.** PBM at 260 and 130 J doses provided no significant changes on performance ($P = 0.35$), as well as, EMG of dominant lower limb muscles ($P > 0.05$), $[\text{LAC}^-]_{\text{area}}$ ($P > 0.05$), Eox ($P > 0.05$), capillary gasometry aspects ($P > 0.05$), and respiratory gas exchange responses ($P > 0.05$). **Conclusion.** These results suggested that PBM in the used parameters not improve performance during a long-term constant-load cycling effort at the severe domain and not influence physiological responses related to this type of effort.

Keywords: Photobiomodulation, cycling performance, electromyography, ergospirometry, gasometry.

INTRODUCTION

Cycling is a complex exercise, which the key-factor involved on athletes' performance, the ability to sustain high levels of power during the effort (1), is directly influenced by an unavoidable physiological response from the ongoing exercise, called muscle fatigue (2). Muscle fatigue is defined as an exercise-related decrease in the ability to produce desired levels of strength and power, developing gradually soon after the onset of the sustained physical activity (3). This reversible impairment may occur at all levels of motor pathway, from the motor drive and spinal cord (central fatigue) until motor nerve and muscle (peripheral fatigue)(4). Peripheral muscle fatigue is generally associated to reductions in energy supply to muscle tissue and increase of metabolic by-products, whereas central muscle fatigue has been mainly related to the inhibitory effects at motor drive and spinal cord of the small diameter afferent muscle fibers sensitive to mechanical, thermal and chemic stimulus(5).

Despite neuromuscular adjustments, muscle fatigue is also associated to muscle ionic, blood acid-base, and respiratory perturbations during effort, which extent are dependent on the exercise intensity (6, 7). Based on physiological indicators of aerobic-anaerobic metabolic pathways transitions during effort, four intensity domains have been usually described, namely moderate, heavy, severe and extreme intensities (6). Specifically to cycling, the performance in track and field events from 800 m up 10.000 m has been incidentally associated to performance in severe intensity domain (8). This intensity encompass power output above critical power in which maximal oxygen uptake can be reached, and, in efforts until exhaustion, it is characterized by the rapidly rise of respiratory responses, depletion of muscle energy substrates, the increase of muscle an blood metabolites and ion concentrations, and increase of neural drive to agonist muscles during effort(7, 9).

Once all these perturbations are associated to muscle fatigue (5, 10), a substantial number of investigations over the last decades focused on discovering means to counteracts its deleterious influences to cycling performance (11). Nowadays, one of the non-pharmacological, non-invasive and legal options available is photobiomodulation (PBM)(12). PBM involves exposing tissue to non-thermal electromagnetic radiation at visible and/or invisible wavelengths through Laser and/or Led devices (13). PBM cell-mechanisms have been essentially demonstrated in *in vitro* and animal model studies, and are associated with absorption of photons by chromophores localized in cells, manly cytochrome c oxidase (Cox) in the respiratory chain, eliciting an increase in ATP resynthesize by oxidative pathway (14). Secondary effects are also suggested and include an increase in blood flow and tissue oxygenation (15, 16), and attenuation of oxidative stress (17, 18).

Specifically to cycling, Leal Junior et al., (19, 20) have evidenced that PBM applied before a Wingate test not produced changes on performance parameters during test (i.e., total work produced, and peak power). However, some limitations of Leal Junior et al., (19, 20) investigations (i.e., low dose delivered to tissue muscle, low irradiated area, no familiarization of participants to cycling effort) may explained the no positive influence of PBM over the cycling performance. Covering all these limitations, Lanferdini et al., (21) recently demonstrated that PBM with 135 J applied on each quadriceps femoris (9 irradiations points of 15 J each) of competitive cyclists was effective to improve (+15%) time to exhaustion on maximal aerobic power intensity (severe domain, ~3 min of duration). The authors also observed higher values of median frequency (Mdf) at high bands of electromyographic signal (EMG) from *quadriceps femoris* at the end of exhaustion test, indicating PBM effects on delay muscle activity impairment during this type of effort.

However, once muscle fatigue has a task-dependent aspect, duration and intensity of the effort determine the contributions of central and peripheral factors involved in muscle fatigue (4). After cycling efforts at severe domain intensity, Thomas et al., (9) have demonstrated that both aspects of muscle fatigue are present, with greater peripheral muscle fatigue observed in short duration (~3 min) than long-term efforts (11-42 min), being this pattern, reversed for central muscle fatigue. Therefore, although Lanferdini et al.,(21) have evidenced PBM effectiveness over a cycling performance and neuromuscular activation, the influence of PBM over longer high-intensity efforts, in which the central aspects of muscle fatigue are also detrimental for performance, remained not investigated. Moreover, once severe domain intensity elicit perturbations on a series of physiological aspects, to investigate these responses during exercise maintenance is an attractive alternative to improve the knowledge of PBM effects as ergogenic resource.

Thus, the purpose of the present study was to investigate the effects of PBM at 130 and 260 J dosage on the time to exhaustion in a long duration constant-load cycling effort at the severe domain, also exploring indicators of muscle activity pattern during the effort through superficial electromyography, blood gas pressure, ion blood concentration, acid-base balance, energy metabolism, and respiratory responses. The 130 J and 260 J dosages will be used, based on the finding of a recent meta-analysis about the ideal dose to improve physical performance (22). Once severe domain intensity is characterized by the large participation of oxidative metabolism (23), our hypothesis is that PBM will improve performance by attenuate muscle activity impairment during effort, which will be evidenced by changes on the physiological responses monitored.

METHODS

The study was conducted in a randomized, double-blind, crossover design aiming to compare the effects of two doses of PBM with the placebo (PLA) condition on the time to exhaustion at cycling effort at the severe domain, and on the kinetic-responses of respiratory gas-exchange, blood lactate and blood gas.

Participants

Thirteen white skin healthy men were included in the study. Participants were recreational cyclists according to guidelines to classify subject groups in sport-science research (24), without vascular disease, metabolic disorders, muscle-skeletal or joint injuries in the previous six months and had not used nutritional or pharmacological substances in this same period. Participants who were regularly absent from the trails, performed exercise, or ingested substances capable of altering neuromuscular function (i.e., caffeine, sodium bicarbonate, alcoholic drinks) at least 24 h before evaluations were excluded from the study, as well as, if presented any muscle-skeletal-joint disorder and/or initiated the use of nutritional and/or pharmacological substances during the study.

Prior to starting the study, participants were informed about the risks, and benefits involved in the tests and then signed a free consent form. All experimental procedures were approved by the local Research Committee (Protocol No 466/12) and were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The flow diagram of the study is presented in Figure 1.

Experimental design

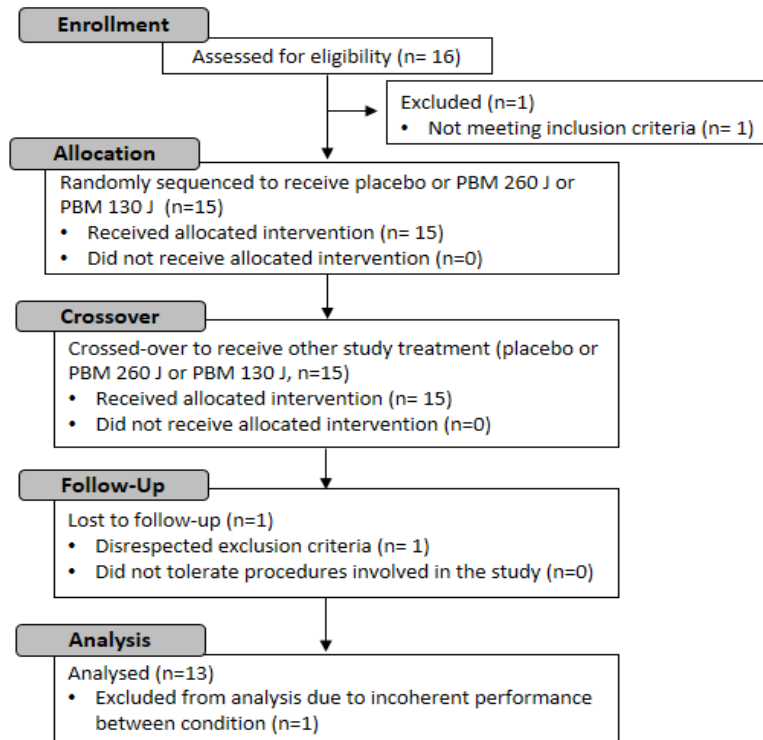
Participants underwent 6 visits at the laboratory which were performed the following procedures: Visit 1) Characterization and maximal graded exercise test (GXT) to measure maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$), the maximal aerobic power (MAP) and the

respiratory compensation point (RCP); Visits 2 and 3) Constant load cycling exercise at severe domain (CLE_{severe}) until exhaustion as familiarizations (FAM₁ and FAM₂); Visit 4, 5 and 6) CLE_{severe} until exhaustion preceded by two PBM doses and PLA interventions, in a crossover randomized design (Figure 1). All efforts were performed on an electromagnetic-braked cycle ergometer (Lode-Excalibur Sport, Lode BV, Groningen, Netherlands) with an individually free choice cadence remaining in a range of ± 5 rpm, between 60-100 rpm, defined previously the begin of the GXT. During the last three visits, CLE_{severe} was performed associated to surface electromyography (EMG) of dominant lower limb muscles, respiratory gas exchange measures, and capillary blood samples collections to determine kinetic-responses of blood lactate concentration and capillary gasometry during effort (i.e., gas, ion, and acid-base balance markers). All participants performed all procedures during the same period of the day, separated by a minimum interval of 48h, finalizing the study in a period of 3 to 4 weeks.

Graded exercise test

The GXT was performed in a temperature controlled room ($19 \pm 1^\circ \text{C}$) and initiated at 100 W with increments of 25 W at each 2 min stage until voluntary exhaustion, defined as the inability to maintain the pre-set range cadence during 5 s (25). During GXT, respiratory responses were registered breath-by-breath using a stationary gas analyzer Quark CPET (Cosmed, Rome, Italy), previously calibrated in accordance with the manufacturer's instructions. Data were smoothed every 10-points and interpolated every 1 s using software OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA). The oxygen uptake for each GXT completed stage was measured considering the average of the last 20 s of the stage. The highest $\dot{V}\text{O}_2$ the average was assumed as $\dot{V}\text{O}_{2\text{peak}}$. MAP was assumed as the lowest intensity that $\dot{V}\text{O}_{2\text{peak}}$ was reached and RCP was determined from plots from ventilatory equivalent for dioxide carbon ($\dot{V}_E / \dot{V}\text{CO}_2$) vs workload, assuming RCP as the intensity equivalent to a disproportionate increase in $\dot{V}_E / \dot{V}\text{CO}_2$ (iRCP)(26).

Flow-diagram



General experimenta design

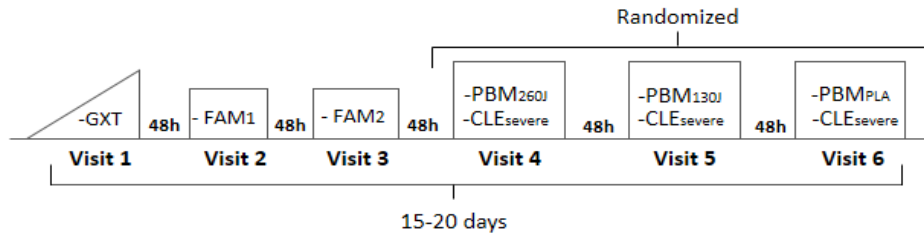


Figure 1. Flow-diagram and general experimental design of the study. GXT = graded exercise test until exhaustion, FAM = constant cycling effort until exhaustion as familiarization; FAM₁ and FAM₂ = constant load cycling effort until exhaustion as familiarizations; CLE_{severe} = constant cycling effort until duration precede by some intervention; PBM₂₆₀ = photobiomodulation at 260 J dose; PBM₁₃₀ = photobiomodulation at 130 J dose; PBM_{PLA} = photobiomodulation at 0 J dose.

Constant cycling effort at the severe domain

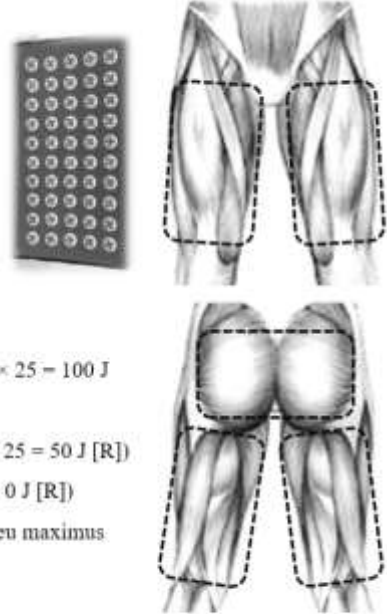
CLE_{severe} was performed at 60% of the difference between MAP and RCP ($[\Delta 60]$, severe intensity domain) calculated as equation 1 (Eq1)(9). This intensity was chosen due to the large contribution of oxidative metabolism to resynthesize ATP (23), a scenario more favorable to the influence of PBM, and by eliciting a decrease on both components of the neuromuscular system (central and peripheral)(9), allowing a broader investigation of the effects of PBM. Before all CLE_{severe}, participants performed a 6 min warm-up at 60% of MAP (27), followed by 4 all-out sprints of 5 s, starting the efforts after 4 min passive rest. Time to exhaustion (T_{lim}) was expressed in seconds.

$$\text{Eq.1} \quad \Delta 60\% = ([\text{MAP} - \text{RCP}] \times 0.6 + \text{RCP})$$

Photobiomodulation and placebo interventions

PBMs were performed with fixed parameters 15 min before CLE₆₀ using a multi-diode array (Table 1). PBM energy and power of irradiation were based on a recent systematic review with meta-analysis (22) regarding PBM on physical performance improvements. Placebo (PLA) condition consisted of fake irradiation during 60 s, with multi-diode array turned-off. An investigator not involved in data collection and processing performed all interventions. The orders of treatments were chosen through simply balanced randomization. In all conditions, the multi-diode array was in direct contact (i.e., 90° angle) with the skin surface and the participants were blindfolded and wore headphones (hearing a standard song) to avoid perceive light and/or sound signal from the device.

Table 3. Parameters of multi-diode array and photobiomodulation, irradiation.

Area of multi-diode array	18 x 38 cm (684 cm ²)	
Number of LEDs	200 (25 x 4 [IR] and 25 x 4 [R])	
Area of effective irradiation	157 cm ² (50 x 3.14 cm ²)	
Wavelength	850 ± 20nm (IR) and 630 ± 10nm (R)	
Frequency	Continuous output	
Optical output (group with 4 LEDs)	80mW (IR) and 50mW(R)	
LED spot size	0.2cm ²	
Treatment time	PBM ₂₆₀ : 80s; PBM ₁₃₀ : 40s; PBM _{PLA} : 60s	
Total energy delivered (muscle group)	PBM ₂₆₀ : 260J (6.4 x 25 = 160 J [IR] + 4 x 25 = 100 J [R]) PBM ₁₃₀ : 130J (3.2 x 25 = 80 J [IR] + 2 x 25 = 50 J [R]) PBM _{PLA} : 0J (0 x 25 = 0 J [IR] + 0 x 25 = 0 J [R])	
Muscle groups	Quadriceps femoris; hamstrings and gluteu maximus	
Total energy delivered (related to area)	PBM ₂₆₀ : 1.65 J per cm ² of tissue area PBM ₁₃₀ : 0.82 J per cm ² of tissue area PBM _{PLA} : 0 J per cm ² of tissue area	
Application mode	Devide held coupled in skin contact	

R=red; IR = infrared; PBM = photobiomodulation.

Surface electromyography

EMG signal during CLE was acquired using a Wave Wirelles EMG device (Cometa System, Milan, Italy), with a sample rate of 2000 Hz. Before electrode placement, the skin was washed, lightly abraded and cleaned with alcohol 70% to remove hair, surface layers of dead skin, and oil. Electrodes of Ag/AgCl (Medtrace, 3.2 x 2.8 cm, Covidien, Canada) were positioned in the *rectus femoris* (RF), *vastus lateralis* (VL), *biceps femoris* (BF) and *gluteus maximus* (GM) of dominant lower limb according to Surface Electromyography for No-Invasive Assessment of Muscles (SENIAM) (28) recommendations. The EMG signal acquired was posteriorly band-pass filtered (20-500 Hz) and the root mean square (RMS) and median frequency (MF) for 4 time bands (0-25%, 25-50%, 50-75% and 75-100%) were calculated through the software MatLab R2015a (Mathworks, Massachusetts, USA) in an isotime design, based on the shortest time to exhaustion reached among the CLE_{severe} performed in the last three visits. Root mean square (RMS) and median frequency (MdF) data were normalized by the highest values observed in CON.

Respiratory gas exchange

According to measures during GXT, in the CLE_{severe} the same equipment and software were used to collect and smooth gas exchange data. Previously the tests began, participants remained seated during 5 min to collect basal responses, assumed as the mean of the last 2 min data. During exercise, two time window was assumed (i.e., 50% and 100%) based on the shortest time to exhaustion reached among the CLE_{severe} performed in the last three visits, aiming to compare responses in an isotime design among the three conditions. The mean data of the last 20 s was used to represent each time window. Oxygen uptake ($\dot{V}O_2$), ventilation ($\dot{V}_E$), respiratory exchange ratio (RER); ventilatory equivalent for oxygen ($\dot{V}_E \cdot \dot{V}O_2^{-1}$), and ventilatory equivalent for carbon dioxide ($\dot{V}_E \cdot \dot{V}CO_2$) were measured. In addition, the energetics from the oxidative pathway (E_{Ox}) was calculated by the trapezoidal method using software OriginPro 8.0, assuming E_{Ox} as the difference between $\dot{V}O_2$ the area measured during CLE_{severe} and $\dot{V}O_2$ basal area(29).

Blood sample collection and analysis

Aiming to investigate kinetic-response of blood lactate concentration ($[LAC^-]$), blood samples from ear lobe (25 μ L) were collected through heparinized capillaries at the same moment of effort in the three conditions (i.e., isotime design), which were rest (basal), 25%, 50%, 75% and 100% of the higher Tlim reached between the two FAMs, decreased in 10% (i.e., 90% of higher Tlim reached in the FAMs). Furthermore, 5 and 7 min after effort, collections were also performed to measure peak blood lactate concentration ($[LAC^-]_{peak}$). Immediately after collections, samples were deposited into microtubes containing 50 μ L of sodium fluoride at 1%, and posteriorly analyzed in an electrochemical analyzer YSI 2900 Stat Plus (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA), being expressed as $mmol \cdot L^{-1}$. The mathematical area below curve of $[LAC^-]$ ($[LAC^-]_{area}$) during exercise was calculated using the results (axis Y) obtained in the four moments (axis X) of collections (i.e., 25%, 50%, 75%, and 100%) through software OriginPro 8.0, deducting the area of $[LAC^-]$ basal.

Regarding capillary gasometry, samples from ear lobe (60 μ L) were also collected through heparinized capillaries at the same moment of effort in the three conditions (i.e., isotime design), which were rest (basal), 50% and 100% of the higher Tlim reached between the two FAMs, decreased in 10% (i.e., 90% of higher Tlim reached in the FAMs). Immediately after collections, samples were analyzed in RAPIDLab 348EX gasometer (Siemens Healthcare Diagnostics, Camberley, UK) to measure blood pH, bicarbonate (HCO_3), base excess (BE), potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}), capillary oxygen pressure (pO_2) and capillary carbon dioxide pressure (pCO_2).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the software package SPSS version 20.0 (IBM Corp., New York, USA). Data are presented as mean and standard deviations (mean $\pm$ SD) and 95% confidence interval (CI95%). A two-way ANOVA was used to both compare EMG responses during CLE_{severe} between conditions (i.e., PBM₂₆₀, PBM₁₃₀, and PBM_{PLA} [factor condition]), within-conditions (i.e., 25%, 50%, 75%, and 100% of the Tlim at CLE_{severe} [factor time]), and the interaction between the factors (condition $\times$ time), as well as, the capillary gasometry, and respiratory gas exchange response between conditions, within-conditions (i.e., basal, 50%, and 100%), and the interaction between the factors (condition $\times$ time). In order to compare the Tlim, $[LAC^-]_{area}$, $[LAC^-]_{peak}$, and E_{Ox} , a one-way repeated measure ANOVA was used. In all cases, the Mauchly's test of sphericity was applied and Greenhouse-Geisser Epsilon correction (P and F values) were used when the sphericity criteria were not met. When necessary, the analyses were

completed with SIDAK *post hoc*. The significance level of 5% was assumed in all cases. Cohen's effect sizes (Cohen's *d*) to Tlim were paired calculated (i.e., $PBM_{260} \times PBM_{PLA}$, and $PBM_{130} \times PBM_{PLA}$) based on means and standard deviations, with the magnitude of the effect size interpreted as: *trivial* = <0.20; *small* = 0.21-0.5; *moderate* = 0.51-0.79; *large*=0.80–1.29; *very large* = >1.30. In addition, a Pearson correlation test was used to explore associations among the variables investigated in the present study.

Results

The $\dot{V}O_{2peak}$ reached in the GXT was 48.10 ± 4.81 (45.32 to 50.87) $mL \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$. The MAP and iRCP were 3.69 ± 0.10 (3.46 to 3.92) $W \cdot kg^{-1}$ and 2.91 ± 0.11 (2.66 to 3.16) $W \cdot kg^{-1}$, respectively. The intensity of CLE_{severe} was 3.38 ± 0.10 (3.16 to 3.60) $W \cdot kg^{-1}$, which represents 91.46 ± 0.72 (89.89 to 93.02) % of MAP.

No significant alterations were observed on Tlim ($F = 1.08_{[2, 24]}, p = 0.35$), $[LAC^-]_{area}$ ($P = 0.08$), $[LAC^-]_{peak}$ ($P = 0.37$), and Eox ($P = 0.09$) (Table 2). Regarding Cohen's ES, on the Tlim was evidenced a trivial effect between $PBM_{260} \times PBM_{PLA}$ ($d = 0.11$), and $PBM_{130} \times PBM_{PLA}$ ($d = 0.16$).

CLE_{EMG} responses of RMS and MdF during the time bands of CLE_{severe} , normalized by the highest values reached in PBM_{PLA} , are presented in Figure 2. No significant interactions were observed to RMS values of RF ($P = 0.34$), VL ($P = 0.20$), BF ($P = 0.27$), and GM ($P = 0.90$) muscles. However, a time effect ($p < 0.01$) was observed in all muscles, evidencing higher values of RMS in the 75-100% time band, compared to the others (post hoc $p < 0.01$). Similarly to RMS, no interactions were observed to MdF values of RF ($P = 0.23$), VL ($P = 0.07$), BF ($P = 0.07$) and GM ($P = 0.43$) muscles. Besides, a time effect ($P < 0.01$) for all muscle was observed, evidencing smaller values of MdF in the 75-100% time band of RF (compared to 0-25%), VL (compared to 25-50%, and 50-75%), BF (compared to 25-50%, and 50-75%), and GM (compared to 75-100% to all the others), post hoc $P < 0.05$).

Capillary gasometry data are presented in Table 3. No significant differences were observed at rest among the three conditions in all variables of capillary blood gasometry ($p > 0.05$). All conditions presented decrease (i.e., time effect) on pH ($P < 0.01$), HCO_3^- ($P < 0.01$), BE ($P = 0.01$), and PCO_2 ($P < 0.01$) levels, comparing the last measure (i.e., 100%) with the basal values (post hoc $P < 0.01$), not evidencing interaction effect to pH ($P = 0.62$), HCO_3^- ($P = 0.36$), BE ($P = 0.37$), and PCO_2 ($P = 0.85$). Otherwise, K^+ presented an increase in all conditions ($P < 0.01$), comparing basal with 100% values (post hoc, $p < 0.01$) also with no interaction effect ($P = 0.25$), while Ca^{++} ($P = 0.12$) and PO_2 ($P = 0.17$) were not altered by the CLE_{severe} .

Regarding respiratory gas exchange data (Table 4), all variables were not different ($P > 0.05$) at the basal moments among the three conditions. A time effect was observed in $\dot{V}O_2$ ($P < 0.01$), $\dot{V}_E$ ($P < 0.01$), $\dot{V}_E \cdot \dot{V}O_2^{-1}$ ($P < 0.01$), and RER ($P < 0.01$), evidencing an increase comparing 100% to basal values. $\dot{V}_E \cdot \dot{V}CO_2$ also presented a time effect ($P < 0.01$), evidencing a decrease on 50% measures compared to basal levels, and an increase comparing 100 to 50% moment (post hoc, $P < 0.01$). No interactions effect were observed to $\dot{V}O_2$ ($P = 0.41$), $\dot{V}_E$ ($P = 0.32$), $\dot{V}_E \cdot \dot{V}O_2^{-1}$ ($P = 0.54$), $\dot{V}_E \cdot \dot{V}CO_2$ ($P = 0.28$), and RER ($P = 0.15$). A condition effect ($P = 0.01$) was observed in PBM_{260} to $\dot{V}_E \cdot \dot{V}O_2^{-1}$, which were 3.73% (post hoc, $P = 0.03$) and 3.06% (post hoc, $P = 0.04$) higher than PBM_{130} and PBM_{PLA} , respectively.

Table 2. Time to exhaustion reached on the constant cycling exercise at the severe domain, the area under the curve of blood lactate produced during the effort, the energy produced by oxidative pathway during effort, and blood peak lactate after effort.

	PBM₂₆₀	PBM₁₃₀	PBM_{PLA}
<i>Tlim</i> (s)	537.00 ± 185.93 (424.64 to 649.35)	544.00 ± 172.06 (440.02 to 647.97)	519.46 ± 149.97 (428 to 610.08)
Eox (mL·Kg⁻¹)	319.14 ± 134.45 (237.89 to 400.39)	319.28 ± 129.86 (240.80 to 397.76)	327.31 ± 137.55 (244.18 to 410.43)
[LAC_{area}] (%·mmol·L⁻¹)	454.94 ± 172.12 (350.89 to 558.98)	425.93 ± 161.42 (328.38 to 523.49)	417.04 ± 164.97 (317.34 to 516.74)
[LAC_{peak}] (mmol·L⁻¹)	10.53 ± 2.27 (9.15 to 11.90)	9.93 ± 2.02 (8.71 to 11.16)	10.25 ± 2.17 (8.94 to 11.57)

Tlim = Time to exhaustion reached on the constant cycling exercise at severe domain; Eox = energy contribution from aerobic pathway; [LAC_{area}] = mathematical area below the curve of blood lactate produced during effort; [LAC_{peak}] = peak of blood lactate concentration after effort; PBM₂₆₀ = PBM with 260 J dose; PBM₁₃₀ = PBM with 130 J dose; PBM_{PLA} = PBM with 0 J dose.

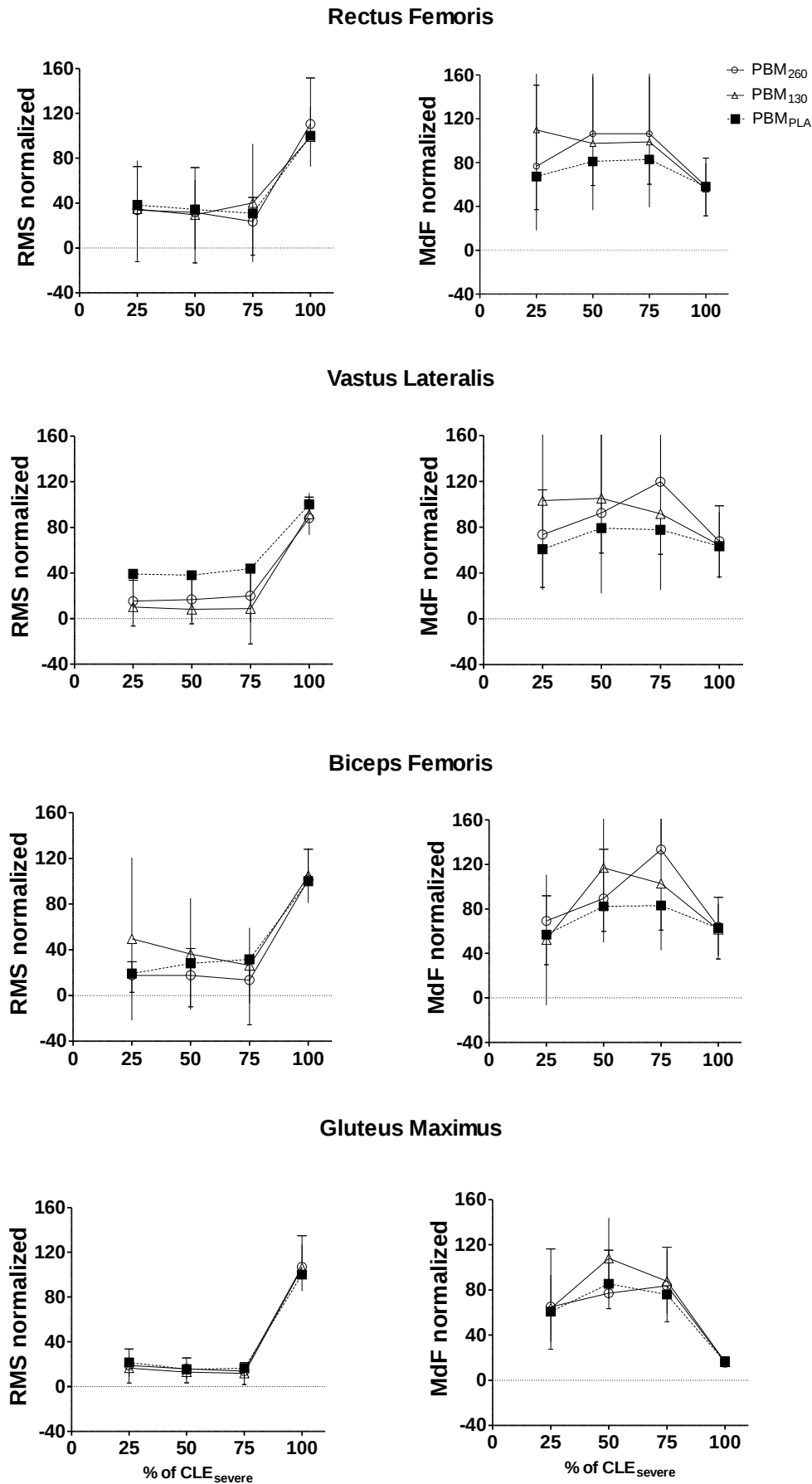


Figure 4. Surface electromyographic responses measured during constant cycling effort at severe domain, normalized by the highest values observed in placebo condition. RMS = root mean square; MdF = median Frequency; % of CLE_{severe} = percentage of time to exhaustion reached in the shortest CLE_{severe}. PBM₂₆₀ = PBM with 260 J dose; PBM₁₃₀ = PBM with 130 J dose; PBM_{PLA} = PBM with 0 J dose.

Table 3. Kinetic response of capillary blood gasometry during a constant load cycling effort at the severe domain.

		PBM₂₆₀	PBM₁₃₀	PBM_{PLA}
pH (a.u)	<i>Basal</i>	7.51 ± 0.02 (7.5 to 7.53)	7.51 ± 0.02 (7.49 to 7.52)	7.51 ± 0.02 (7.49 to 7.53)
	<i>50%</i>	7.39 ± 0.04 (7.36 to 7.42)	7.39 ± 0.05 (7.35 to 7.43)	7.38 ± 0.03 (7.36 to 7.41)
	<i>100%*</i>	7.33 ± 0.05 (7.29 to 7.37)	7.35 ± 0.06 (7.31 to 7.39)	7.31 ± 0.11 (7.24 to 7.39)
HCO₃ (mmol·L⁻¹)	<i>Basal</i>	28.11 ± 1.07 (27.11 to 29.11)	27.94 ± 1.22 (26.81 to 29.07)	28.45 ± 1.87 (26.72 to 30.19)
	<i>50%</i>	20.90 ± 1.80 (19.23 to 22.56)	20.25 ± 1.26 (19.08 to 21.42)	20.40 ± 1.60 (18.91 to 21.88)
	<i>100%*</i>	17.28 ± 2.05 (15.38 to 19.18)	17.21 ± 1.95 (15.40 to 19.02)	15.47 ± 3.59 (12.14 to 18.79)
BE (mmol·L⁻¹)	<i>Basal</i>	3.91 ± 1.27 (2.84 to 4.98)	3.92 ± 1.25 (2.87 to 4.97)	4.52 ± 1.88 (2.94 to 6.10)
	<i>50%</i>	-4.76 ± 2.35 (-6.73 to -2.79)	-5.81 ± 2.40 (-7.82 to -3.80)	-4.80 ± 2.04 (-6.50 to -3.09)
	<i>100%*</i>	-9.88 ± 3.26 (-12.62 to -7.15)	-9.50 ± 2.55 (-11.63 to -7.36)	-11.66 ± 5.37 (-16.15 to -7.16)
K⁺ (mmol·L⁻¹)	<i>Basal</i>	4.76 ± 0.68 (4.27 to 5.25)	4.46 ± 0.57 (4.05 to 4.87)	4.41 ± 0.51 (4.04 to 4.78)
	<i>50%</i>	5.89 ± 0.71 (5.37 to 6.40)	5.87 ± 0.63 (5.42 to 6.32)	5.91 ± 0.90 (5.26 to 6.55)
	<i>100%*</i>	6.17 ± 0.75 (5.63 to 6.71)	5.57 ± 0.53 (5.18 to 5.95)	5.68 ± 0.76 (5.14 to 6.23)
Ca⁺⁺ (mmol·L⁻¹)	<i>Basal</i>	0.93 ± 0.10 (0.85 to 1.00)	0.96 ± 0.11 (0.88 to 1.04)	0.91 ± 0.11 (0.83 to 0.99)
	<i>50%</i>	0.97 ± 0.13 (0.87 to 1.06)	1.00 ± 0.06 (0.96 to 1.05)	1.05 ± 0.21 (0.89 to 1.20)
	<i>100%</i>	0.97 ± 0.10 (0.89 to 1.05)	0.96 ± 0.10 (0.88 to 1.04)	0.92 ± 0.17 (0.80 to 1.05)
pO₂ (mmHg)	<i>Basal</i>	74.88 ± 8.58 (65.86 to 83.89)	77.73 ± 5.41 (72.05 to 83.41)	81.01 ± 8.50 (72.09 to 89.93)
	<i>50%</i>	75.61 ± 10.00 (65.11 to 86.12)	84.36 ± 19.82 (63.55 to 105.17)	86.13 ± 23.64 (61.32 to 110.94)
	<i>100%</i>	91.35 ± 7.90 (83.05 to 99.65)	85.03 ± 20.96 (63.03 to 107.33)	84.11 ± 19.22 (63.93 to 104.29)
pCO₂ (mmHg)	<i>Basal</i>	33.71 ± 1.84 (32.17 to 35.25)	34.16 ± 2.79 (31.82 to 36.50)	33.71 ± 2.58 (31.55 to 35.87)
	<i>50%</i>	30.82 ± 4.55 (27.01 to 34.63)	31.32 ± 4.30 (27.72 to 34.92)	31.66 ± 4.03 (28.29 to 35.03)
	<i>100%*</i>	26.56 ± 2.70 (24.30 to 28.82)	26.58 ± 3.86 (23.36 to 29.81)	25.67 ± 5.41 (21.14 to 30.20)

Values are in mean±SD (CI95%).* = p < 0.05 (ANOVA two-way, time effect, comparing 100% with basal moment). HCO₃ = sodium bicarbonate; BE = base excess; K⁺ = potassium; Ca⁺⁺ = calcium; pO₂ = pressure of oxygen; pCO₂ = pressure of carbon dioxide; PBM₂₆₀ = PBM with 260 J dose; PBM₁₃₀ = PBM with 130 J dose; PBM_{PLA} = PBM with 0 J dose.

Table 4. Kinetic response of respiratory gas exchange during a constant load cycling effort at the severe domain.

		PBM ₂₆₀	PBM ₁₃₀	PBM _{PLA}
$\dot{V}O_2$ (mL·min ⁻¹ ·Kg)	Basal	5.31 ± 0.49 (4.93 to 5.69)	5.25 ± 0.68 (4.72 to 5.78)	5.03 ± 1.07 (4.20 to 5.85)
	50%	45.56 ± 4.58 (42.79 to 48.33)	45.57 ± 5.05 (42.51 to 48.62)	45.98 ± 5.20 (42.83 to 49.13)
	100%*	47.35 ± 4.78 (44.46 to 50.24)	47.58 ± 5.36 (44.34 to 50.83)	48.28 ± 4.20 (45.74 to 50.82)
$\dot{V}_E$ (L·min ⁻¹)	Basal	11.45 ± 0.95 (10.71 to 12.18)	10.95 ± 1.80 (9.56 to 12.33)	10.25 ± 1.87 (8.81 to 11.69)
	50%	112.65 ± 14.04 (104.17 to 121.14)	108.90 ± 15.53 (99.41 to 118.18)	109.65 ± 14.93 (99.41 to 118.18)
	100%*	137.02 ± 12.58 (129.41 to 144.63)	134.10 ± 12.90 (126.30 to 141.90)	137.69 ± 16.10 (127.96 to 147.42)
RER	Basal	0.85 ± 0.08 (0.78 to 0.92)	0.80 ± 0.08 (0.74 to 0.87)	0.82 ± 0.06 (0.76 to 0.87)
	50%	1.10 ± 0.04 (1.07 to 1.12)	1.08 ± 0.04 (1.05 to 1.11)	1.09 ± 0.04 (1.06 to 1.12)
	100%*	1.07 ± 0.03 (1.04 to 1.09)	1.05 ± 0.05 (1.02 to 1.08)	1.06 ± 0.04 (1.03 to 1.09)
$\dot{V}_E \cdot \dot{V}O_2^{-1}$	Basal	30.47 ± 2.74 [#] (28.37 to 32.58)	29.33 ± 3.26 (26.82 to 31.84)	28.93 ± 2.88 (26.71 to 31.14)
	50%	34.58 ± 4.08 [#] (32.11 to 37.05)	33.37 ± 4.15 (30.86 to 35.88)	33.35 ± 4.05 (30.90 to 35.79)
	100%*	40.50 ± 4.18 [#] (37.98 to 43.03)	39.52 ± 4.39 (36.86 to 42.18)	39.84 ± 4.54 (37.10 to 42.59)
$\dot{V}_E \cdot \dot{V}CO_2^{-1}$	Basal	35.94 ± 2.42 (34.07 to 37.80)	36.31 ± 2.16 (34.65 to 37.97)	35.34 ± 3.56 (32.59 to 38.08)
	50% [#]	31.45 ± 4.04 (29.01 to 33.90)	30.76 ± 3.88 (28.41 to 33.10)	30.55 ± 4.34 (27.93 to 33.17)
	100%*	37.90 ± 4.52 (35.17 to 40.63)	37.50 ± 4.49 (34.78 to 40.21)	37.56 ± 5.38 (34.31 to 40.82)

Values are in mean±SD (CI95%). [#] = $p < 0.05$ (ANOVA two-way, time effect, comparing 50% with basal moment) * = $p < 0.05$ (ANOVA two-way, time effect, comparing 100% with 50% moment). $\dot{V}O_2$ = oxygen uptake; $\dot{V}_E$ = ventilation; RER = respiratory exchange ratio; $\dot{V}_E \cdot \dot{V}O_2^{-1}$ = ventilatory equivalent for oxygen ; $\dot{V}_E \cdot \dot{V}CO_2^{-1}$ = ventilatory equivalent for carbon dioxide. PBM₂₆₀ = PBM with 260 J dose PBM₁₃₀ = PBM with 130 J dose; PBM_{PLA} = PBM with 0 J dose.

DISCUSSION

The aim of the present study was to investigate the effect of two doses of PBM on the time to exhaustion in a constant-load cycling exercise at severe domain, also exploring indicators of muscle activation, energy metabolism used during effort, and the responses elicited by muscle fatigue on different physiological systems. We hypothesized that both doses of PBM would result in a longer Tlim by optimizing the oxidative metabolism maintaining for a long duration the equilibrium between oxidative and glycolysis energetic pathways to resynthesize ATP to effort, also increasing the clearance of metabolic by-products from tissue (i.e., , improve local microcirculation). These changes would be probably observed through indicators of glycolysis metabolism activity (i.e., blood lactate concentration), muscle acidosis (i.e., capillary and respiratory responses), and muscle electrical activity impairment during effort. However, despite the increase on $\dot{V}_E \cdot \dot{V}O_2^{-1}$ due to PBM (both 130 J and 260 J doses), no other neuromuscular, respiratory and blood marker was changed, as well as Tlim.

Once more invasive measures related to specific PBM cell-mechanisms in humans are more difficult to be conducted due to different issues (i.e., voluntary adhesion, demand

for specialized technical staff and high financial support), these kind of wide monitoring of physiological responses during exercise helps to go more insight in PBM ergogenic effects over neuromuscular and others physiological systems. Furthermore, in the present study, all measures and comparisons were performed in an isotime design to ensure that any possible differences could be exclusively due the PBM, isolating changes due to exercise duration. The positive effects of PBM would be identified by changes on the normal physiological responses during this type of effort: essential participation in the course of the effort of anaerobic metabolic pathways to resynthesize ATP, rising on blood lactate concentrations, and decreasing blood pH, HCO_3^- , and BE; increase on $\dot{V}_E$ and $\dot{V}_E \cdot \dot{V}\text{CO}_2$ due to muscle acidosis; increase of motor unit recruitment in the lower limb muscles (evidenced by increase on RMS from EMG signal and $\dot{V}\text{O}_2$) associated to a decrease on activation of high-frequency motor units (decrease on MdF from EMG signal) due to muscle fatigue; rising on $[\text{K}^+]$ on blood, due to failure on ion pumps at sarcolemma (6, 7, 9).

This kind of physiological monitoring during effort it is rare in studies involving PBM ergogenic effects. De Marchi et al. (17), in one of the few investigations in this scenario, tested the PBM ergogenic effects applying 180 J on *quadriceps femoris* (6 points of irradiation, 30 J each) 120 J on hamstrings (4 points of irradiation, 30 J each) and 60 J on *triceps femoris* (2 points of irradiation, 30 J each), previous to running incremental test, and observed that PBM increase the time to exhaustion (+2%), and relative $\dot{V}\text{O}_{2\text{peak}}$ (+2,29%), without influences on respiratory indicators of aerobic and anaerobic thresholds. Besides, these authors also observed a PBM influence over oxidative stress, decreasing the levels of protein and lipid markers of oxidation after effort. This result is direct linked to PBM basic cell-mechanism on attenuate oxidative stress(18), and was pointed out by the author as the responsible for the performance improvement.

As previously described, specifically to cycling, Lanferdini et al., (21) have been observed a positive ergogenic effect of PBM on improve time to exhaustion during a cycling effort on MAP intensity, also evidencing the activation of high-frequency motor units of the *quadriceps femoris* at the end of the test. Once muscle fatigue provides a decrease of activation of this type of motor unit during effort (30), this change demonstrates the capacity of PBM on delay muscle activity impairment. The authors not conducted any physiological measure directed associated to any PBM cell-mechanisms, but inferred that the positive effect observed occurred due to PBM capacity on improve oxygenation and microcirculation, which has been demonstrated in animal models (31) and human studies (15).

The participants of Lanferdini et al., (21) study were competitive road cyclist (MAP intensity of ~410 W), more trained than the participants of the present study (MAP intensity of ~ 266 W). More endurance trained cyclists have some specific muscle adaptations as more predominance of oxidative fiber in lower limb muscle, and higher capillary density(32), which may facilitate the effectiveness of PBM as ergogenic resource(33). Besides, the concomitant contribution of the central aspect to muscle fatigue in the type of effort used in the present study ($\Delta 60\%$, ~540-s, long-term severe domain intensity)(9) may also have generated an impairment on neuromuscular system activity that was huge too much to be counteracted by PBM with the used parameters.

Furthermore, in the present study, the total dose of irradiation used were based on the findings of recent meta-analysis review that delimited the ideal window to provide performance improvements (60-300 J to large muscle groups) (22). However, several different devices have been used (i.e., single diodes vs multi-diodes) during PBM

irradiation, may provide that different areas of target muscles are irradiated. Once the area irradiated over the target tissue seems to be essential to PBM provide effects over cell activities (33, 34). The scientific community, trying better standardizing PBM dose parameters, have been usually reporting the dose of PBM as energy density (J/cm^2). However, even this assumption might be causing misleading interpretation that could be misrepresenting the results of the studies about PBM ergogenic effects.

As described by Hode and Tunér (187) to discuss the findings by the average energy delivered through the skin surface covering the target tissue (J/cm^2 of tissue area) instead of the energy density (J/cm^2) should be considered. For example, if we consider a spot size of 0.02 cm^2 to deliver 5 J of energy, most of the studies will describe that the energy density of $250 \text{ J}/\text{cm}^2$ was applied over the target area. However, if we consider the point of irradiation surrounded by a surface of 1 cm^2 , using the same device in the same parameters, the average dose delivered to this area will be actually $5 \text{ J}/\text{cm}^2$ (35).

Once the most of the studies not report the aperture area of the PBM device used, make inferences about the total tissue area irradiated is difficult. Among the few investigation reporting this information are Miranda et al.,(36) and Dellagrana et al.,(37) studies. Both investigation have evidenced an increase on time to exhaustion during an incremental running test after PBM application on knee extensor, hamstrings and triceps surae muscles. Miranda et al.,(36) irradiated an total dose of $1.5 \text{ J}/\text{cm}^2$ of tissue area over knee extensors, hamstrings and triceps surae, while Dellagrana et al.,(37) irradiated an total dose $0.99 \text{ J}/\text{cm}^2$ of tissue area over these same group muscles. In the present study, PBM was used with $1.65 \text{ J}/\text{cm}^2$ and $0.82 \text{ J}/\text{cm}^2$ of tissue area dosages however, once specific investigations of PBM mechanisms (i.e., measure of ATP resynthesis by oxidative pathway, measure of blood flow to lower limb muscles, measure of oxidative stress) were not conducted, it is difficult to suggest if the PBM not had influence over the cell activities or if this influence indeed existed, being however, too small to change neuromuscular system activity during and after effort.

It is important to emphasize that, despite Vanin et al., (22) have been suggested the ideal therapeutic window of 60 – 300 J as the ideals to provide PBM ergogenic effects in large muscle groups, this therapeutic window represent 75% of the doses with positive results. As evidenced by Hemming et al., (38), PBM delivered by 6 points of irradiations over *quadriceps femoris* (28.2 cm^2 each, total of 169.2 cm^2 irradiated area) at dosages of 522 J ($3.08 \text{ J}/\text{cm}^2$ of tissue area) and 1044 J ($6.16 \text{ J}/\text{cm}^2$ of tissue area), provided a positive influence on neuromuscular system, improving time to exhaustion in an isolated knee flexion-extension fatigue protocol. Therefore, during efforts at severe intensity domain in which observes a large impairment in neuromuscular system, this type of large PBM dosages could be necessary to elicit an ergogenic effects further improving performance and changing physiological responses.

Furthermore, Rossato et al.(39) observed that PBM at 270 J, applied on *quadriceps femoris* 6h + immediately previously isokinetic fatigue protocol (45 flexion-extension concentric at $180^\circ \cdot \text{s}^{-1}$), promoted fewer torque decrements on peak isokinetic force of knee extensors, comparing to control, placebo and PBM applied immediately before fatigue protocol. This finding support another discussed treatment aspect of PBM, its time-response characteristic that has already previously demonstrated in an animal model study (40) and. The time-response aspect of PBM suggest the need of a 6-h time window between the treatment and the effort to further notice high influences of PBM over physiological systems(40). This treatment aspect was not investigate in the present

study and could be associated to no significant influences of PBM over performance and physiological responses.

In addition, the participants of the present study have other physiological individualities that could hinder the PBM effects among subjects as variations in color skin tonality, fat percentage of lower limb, proportion of oxidative fiber (type I) in lower limb muscles, and transversal section area of lower limb muscles (33, 41). Indeed, a significant increase on $\dot{V}_E \cdot \dot{V}O_2^{-1}$ after PBM with 260 J was found. However, this isolated finding, without any other significant changes on physiological responses (mainly $\dot{V}_E$ and $\dot{V}O_2$ isolated) and time to exhaustion, difficult create inferences about the real ergogenic effects of PBM on respiratory responses at severe domain long-term efforts.

CONCLUSION

The results of the present study indicating no influence of PBM with the parameters used on the performance of a constant-load long duration cycling effort at severe domain, as well as, on the muscle activation pattern, energy metabolism, capillary gasometry, and respiratory gas exchange responses during effort. Future studies should be conducted investigating PBM effects on human performance with different treatment parameters (i.e., total dose delivered, time of irradiation before effort) to provide a better knowledge about PBM ergogenic effects.

LIMITATIONS

This study has some limitations. Time trial efforts could not be conducted to measure performance due to personal athlete strategy, making impossible comparison during time bands of effort. We were also unable to perform measures directly related to PBM cell mechanisms, as the increase in cytochrome c oxidase activity. Other assessments, as the Doppler ultrasonography of lower limb blood vessels to investigate changes on microcirculation, measures of nitrite concentration to explore nitric oxide bioavailability on blood, and measures of molecules related to oxidative stress could not be conducted in the present study too. Moreover, the time-response aspect of PBM(40), which has been highlighted as a key factor to its effectiveness, was not addressed in the present study. Thus, these type of effort, and these physiological changes, need to be explored in future studies, as well as, PBM time-response characteristic, to further provide a better understanding about PBM effects over muscle tissue and performance.

REFERENCES

1. Faria E, Parker D, Faria I. The science of cycling: physiology and training - part 1. *Sport Med.* 2005;35(4):285–312.
2. Abbiss CR, Laursen PB. *Models to explain fatigue during prolonged endurance cycling.* 2005. 865-898 p.
3. Enoka RM, Stuart DG. Neurobiology of muscle fatigue. *J Appl Physiol.* 1992;72(5):1631–48.
4. Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev.* 2001;81(4):1725–89.
5. Taylor JL, Amann M, Duchateau J, Meeusen R, Rice CL. *Neural contributions to muscle fatigue: From the brain to the muscle and back again.* 2016. 2294-2306 p.
6. Burnley M, Jones AM. Power–duration relationship: Physiology, fatigue, and the limits of human performance. *Eur J Sport Sci.* 2018;18(1):1–12.
7. Black MI, Jones AM, Blackwell JR, et al. Muscle metabolic and neuromuscular determinants of fatigue during cycling in different exercise intensity domains. *J*

- Appl Physiol.* 2017;122(3):446–59.
8. Jones AM, Vanhatalo A. The ‘Critical Power’ Concept: Applications to Sports Performance with a Focus on Intermittent High-Intensity Exercise. *Sport Med.* 2017;47(s1):65–78.
 9. Thomas K, Elmeua M, Howatson G, Goodall S. *Intensity-Dependent Contribution of Neuromuscular Fatigue after Constant-Load Cycling.* 2016. 1751-1760 p.
 10. Hureau TJ, Romer LM, Amann M. The ‘sensory tolerance limit’: A hypothetical construct determining exercise performance? *Eur J Sport Sci.* 2016;0(0):1–12.
 11. Wan JJ, Qin Z, Wang PY, Sun Y, Liu X. Muscle fatigue: General understanding and treatment. *Exp Mol Med.* 2017;49(10):e384-11.
 12. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: Performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med.* 2012;1(4):267–86.
 13. Chung H, Dai T, Sharma S, Huang Y, Carroll J, Hamblin M. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(2):516–33.
 14. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1999;49(1):1–17.
 15. Wang X, Tian F, Soni SS, Gonzalez-Lima F, Liu H. Interplay between up-regulation of cytochrome-c-oxidase and hemoglobin oxygenation induced by near-infrared laser. *Sci Rep.* 2016;6(August):1–10.
 16. Lohr NL, Keszler A, Pratt P, Bienengraber M, Warltier DC, Hogg N. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: Potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(2):256–63.
 17. Marchi T De, Cesar E, Leal P, Lopes-martins RÁB, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running : effects on exercise performance , skeletal muscle status , and oxidative stress. 2012;231–6.
 18. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol.* 2018;94(2):199–212.
 19. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Vanin AA, et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci.* 2009;24(3):425–31.
 20. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Baroni BM, et al. Comparison between single-diode low-level laser therapy (LLLT) and LED multi-diode (cluster) therapy (LEDT) applications before high-intensity exercise. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(4):617–23.
 21. Lanferdini FJ, Bini RR, Baroni BM, Klein KD, Carpes FP, Vaz MA. Low-Level Laser Therapy Improves Performance and Reduces Fatigue in Competitive Cyclists. *Int J Sports Physiol Perform.* 2017;1–27.
 22. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD, Costa LOP, Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2018;33(1):181–214.
 23. Pooles DC, Ward SA, Gardner GW, Whipp BJ. Metabolic and respiratory profile of the upper limit for prolonged exercise in man. *Ergonomics.* 1988;31(9):1265–79.
 24. Pauw K De, Roelands B, Cheung SS, Geus B De. Guidelines to Classify Subject Groups in Sport-Science Research [Internet]. 2013;(September 2014) doi:10.1123/ijsspp.8.2.111.

25. Miyagi WE, Zagatto AM. Maximal Oxygen Uptake cannot be Determined in the Incremental Phase of The Lactate Minimum Test on a Cycle Ergometer. 2015;(June):372–8.
26. Binder RK, Wonisch M, Corra U, et al. Methodological approach to the first and second lactate threshold in incremental cardiopulmonary exercise testing. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008;15(6):726–34.
27. Bishop D. Warm up II: Performance changes following active warm up and how to structure the warm up. *Sport Med.* 2003;
28. Hermens HJ, Freriks B, Disselhorst-Klug C, Rau G. Development of recommendations for SEMG sensors and sensor placement procedures. *J Electromyogr Kinesiol.* 2000;10(5):361–74.
29. Zagatto AM, Bertuzzi R, Miyagi WE, Padulo J, Papoti M. MAOD Determined in a Single Supramaximal Test : a Study on the Reliability and Effects of Supramaximal Intensities. *Int J Sports Med.* 2016;37:700–7.
30. Cifrek M, Medved V, Tonković S, Ostojić S. Surface EMG based muscle fatigue evaluation in biomechanics. *Clin Biomech.* 2009;24(4):327–40.
31. Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med.* 2000;27(5):427–37.
32. Hawley JA, Stepto NK. Adaptations to training in endurance cyclists: Implications for performance. *Sport Med.* 2001;31(7):511–20.
33. Enwemeka CS. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(3):387–93.
34. Ferraresi C, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? [Internet]. *J Biophotonics.* 2016;27(September) doi:10.1002/jbio.201600176.
35. Hode L, Tunér J. Wrong parameters can give just any results. *Lasers Surg Med.* 2006;38(4):343.
36. Miranda EF, Vanin AA, Tomazoni SS, et al. Using pre-exercise photobiomodulation therapy combining super-pulsed lasers and light-emitting diodes to improve performance in progressive cardiopulmonary exercise tests. *J Athl Train.* 2016;51(2):129–35.
37. Dellagrana RA, Rossato M, Sakugawa RL, Baroni BM, Diefenthaler F. Photobiomodulation Therapy on Physiological and Performance Parameters During Running Tests: Dose-Response Effects [Internet]. *J strength Cond Res.* 2018; doi:10.1519/JSC.0000000000002488.
38. Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response.* 2011;9(4):602–18.
39. Hemmings TJ, Kendall KL, Dobson JL. Identifying dosage effect of light-emitting diode therapy on muscular fatigue in quadriceps [Internet]. *J Strength Cond Res.* 2017; doi:10.1519/JSC.0000000000001523.
40. Rossato M, Dellagrana RA, Sakugawa RL, Lazzari CD, Baroni BM, Diefenthaler F. Time Response of Photobiomodulation Therapy on Muscular Fatigue in Humans. *J Strength Cond Res.* 2018;1.
41. Ferraresi C, de Sousa MVP, Huang YY, Bagnato VS, Parizotto NA, Hamblin MR. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci.* 2015;30(4):1259–67.
42. Laakso L, Richardson C, Cramond T. Factors affecting Low Level Laser Therapy. *Aust J Physiother.* 1993;39(2):95–9.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados dos estudos 1 e 2, observamos que a TFBM, nos parâmetros utilizados:

- Não foi capaz de alterar o tempo até exaustão em um esforço de carga constante no domínio severo ($\Delta 60\%$) em cicloergômetro.
- Não foi capaz de alterar a cinética das concentrações de lactato sanguíneas durante esse tipo de esforço.
- Não foi capaz de alterar os padrões de respostas gasométricas e de troca gasosa respiratória durante esse tipo de esforço.
- Apresentou um efeito positivo (ambas as doses, 260 e 130 J) sobre a atividade muscular durante esse tipo de esforço, promovendo, em comparação a condição placebo, maiores valores de MdF no sinal eletromiográfico do músculo vasto lateral em estágios finais do esforço,
- Apresentou moderados e pequenos efeitos, não significantes, em indicadores centrais e periféricos de fadiga muscular após esse tipo de esforço.

Dessa forma, de modo geral, a TFBM apresentou um efeito protetivo do sistema neuromuscular durante a execução desse tipo de esforço, apresentando influências moderadas e pequenas, porém não significantes, em indicadores da fadiga muscular após exercício. Entretanto, a TFBM não foi efetiva em aumentar o tempo até a exaustão nesse tipo de exercício assim como, de influenciar marcadores metabólicos, parâmetros de gasometria capilar e características da troca gasosa respiratória durante a execução do esforço.

7. REFERÊNCIAS

1. Taylor JL, Amann M, Duchateau J, Meeusen R, Rice CL. Neural contributions to muscle fatigue: From the brain to the muscle and back again. Vol. 48, *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2016. 2294-2306 p.
2. Enoka RM, Stuart DG. Neurobiology of muscle fatigue. *J Appl Physiol*. 1992;72(5):1631–48.
3. Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev* [Internet]. 2001;81(4):1725–89. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/81/4/1725.full.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581501>
4. Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* [Internet]. 2008;88(1):287–332. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/88/1/287.short>
5. Reid MB. Reactive oxygen species as agents of fatigue. Vol. 48, *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2016. 2239-2246 p.
6. Green HJ. Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise. Vol. 15, *Journal of Sports Sciences*. 1997. p. 247–56.
7. Amann M, Dempsey JA. Locomotor muscle fatigue modifies central motor drive in healthy humans and imposes a limitation to exercise performance. *J Physiol* [Internet]. 2008;586(1):161–73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2375542&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Amann M, Pegelow DF, Jacques AJ, Dempsey JA. Inspiratory muscle work in acute hypoxia influences locomotor muscle fatigue and exercise performance of healthy humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(5):R2036-45.
9. Hureau TJ, Romer LM, Amann M. The ‘sensory tolerance limit’: A hypothetical construct determining exercise performance? *Eur J Sport Sci* [Internet]. 2016;0(0):1–12. Available from:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17461391.2016.1252428>

10. Deschamps T, Hug F, Hodges PW, Tucker K. Influence of experimental pain on the perception of action capabilities and performance of a maximal single-leg hop. *J Pain* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;15(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2013.10.016>
11. Newshole EA, Blomstrand E. Branched-Chain Amino Acids : Metabolism , Physiological Function , and Application. *J Nutr*. 2006;136.
12. Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; Revisiting the link. *Prog Neurobiol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;91(3):200–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.012>
13. Enoka RM, Duchateau J. Muscle fatigue: what, why and how it influences muscle function. *J Physiol*. 2008;586:11–23.
14. Enoka RM, Duchateau J. *Translating Fatigue to Human Performance*. 2016.
15. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2015;33(4):183–4. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2015.9848>
16. Ferraresi C, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? *J Biophotonics*. 2016;27(September).
17. Borsa PA, Larkin KA, True JM. Does phototherapy enhance skeletal muscle contractile function and postexercise recovery? A systematic review. *J Athl Train*. 2013;48(1):57–67.
18. Leal-junior ECP, Vanin AA. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery : A systematic review with meta-analysis diode therapy) on exercise performance and markers of exercise. *Lasers Med Sci*. 2016;30(2):925–39.
19. Kneeboney WJ. Practical Applications of Low Level Laser Therapy. *Pract Pain Manag*. 2006;november/d(December):1–4.

20. Lopes-Martins RÁB, Penna SC, Joensen J, Vereid Iversen V, Magnus Bjordal J. Low level laser therapy [LLLT] in inflammatory and rheumatic diseases: A review of therapeutic mechanisms. *Curr Rheumatol Rev* [Internet]. 2007;3(2):147–54. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L46778119%5Cnhttp://www.ingentaconnect.com/content/ben/crr/2007/00000003/000000002/art00008%5Cnhttp://dx.doi.org/10.2174/157339707780619421%5Cnhttp://sfxhosted.exlibrisgroup.com/galwa>

21. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Dalan F, Ferrari M, Sbabo FM, Generosi RA, et al. Effect of 655-nm Low-Level Laser Therapy on Exercise-Induced Skeletal Muscle Fatigue in Humans. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2008;26(5):419–24. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2007.2160>

22. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Rossi RP, De Marchi T, Baroni BM, De Godoi V, et al. Effect of cluster multi-diode Light Emitting Diode Therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers Surg Med*. 2009;41(8):572–7.

23. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Frigo L, Marchi T de, Rossi RP, Godoi V de, et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise- induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. *J Orthop Sport Phys Ther* [Internet]. 2010;40(8):524–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436237>

24. Marchi T De, Cesar E, Leal P, Lopes-martins RÁB, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running : effects on exercise performance , skeletal muscle status , and oxidative stress. 2012;231–6.

25. Miranda EF, Vanin AA, Tomazoni SS, Dos Santos Grandinetti V, De Paiva PRV, Dos Santos Monteiro Machado C, et al. Using pre-exercise photobiomodulation therapy combining super-pulsed lasers and light-emitting diodes to improve performance in progressive cardiopulmonary exercise tests. *J Athl Train*. 2016;51(2):129–35.

26. Malta EDS, De Poli RAB, Brisola GMP, Milioni F, Miyagi WE, Machado FA, et al. Acute LED irradiation does not change the anaerobic capacity and time to exhaustion during a high-intensity running effort: a double-blind, crossover, and placebo-controlled study: Effects of LED irradiation on anaerobic capacity and performance in running. *Lasers Med Sci* [Internet]. *Lasers in Medical Science*; 2016;31(7):1473–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2011-y>
27. Lanferdini FJ, Bini RR, Baroni BM, Klein KD, Carpes FP, Vaz MA. Low-Level Laser Therapy Improves Performance and Reduces Fatigue in Competitive Cyclists. *Int J Sports Physiol Perform* [Internet]. 2017;1–27. Available from: <http://journals.humankinetics.com/doi/10.1123/ijsp.2016-0187>
28. De Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2016;22(3).
29. Karu TI. Photobiological Fundamentals of Low-Power Laser Therapy. *IEEE J Quantum Electron*. 1987;23(10):1–17.
30. Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: Performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photonics Lasers Med*. 2012;1(4):267–86.
31. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Vanin AA, Baroni BM, Grosselli D, De Marchi T, et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci*. 2009;24(3):425–31.
32. Higashi RH, Toma RL, Tucci HT, Pedroni CR, Ferreira PD, Baldini GS, et al. Effects of Low-Level Laser Therapy on Biceps Brachialis Muscle Fatigue in Young Women. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2013;31(12):586–94. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2012.3388>
33. Dos Reis FA, da Silva BAK, Laraia EMS, de Melo RM, Silva PH, Leal-Junior ECP, et al. Effects of pre- or post-exercise low-level laser therapy (830 nm) on skeletal muscle fatigue and biochemical markers of recovery in humans: double-blind placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2014;32(2):106–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24456143>

34. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Baroni BM, De Marchi T, Taufer D, Manfro DS, et al. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):857–63.
35. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Baroni BM, De Marchi T, Rossi RP, Grosselli D, et al. Comparison between single-diode low-level laser therapy (LLLT) and LED multi-diode (cluster) therapy (LEDT) applications before high-intensity exercise. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(4):617–23.
36. Nampo FK, Cavalheri V, dos Santos Soares F, de Paula Ramos S, Camargo EA. Low-level phototherapy to improve exercise capacity and muscle performance: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2016;1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-1977-9>
37. Westerblad H, Bruton JD, Katz A. Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;316(18):3093–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.019>
38. Egan B, Zierath JR. Review Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metab* [Internet]. 2012;17(2):162–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>
39. Green HJ. Journal of Sports Sciences Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise. *J Sports Sci*. 2010;(November 2011):37–41.
40. Millet GY, Tomazin K, Verges S, Vincent C, Bonnefoy R, Boisson RC, et al. Neuromuscular consequences of an extreme mountain ultra-marathon. *PLoS One*. 2011;6(2).
41. Enoka RM, Baudry S, Rudroff T, Farina D, Klass M, Duchateau J. Unraveling the neurophysiology of muscle fatigue. *J Electromyogr Kinesiol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;21(2):208–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelekin.2010.10.006>
42. Fitts RH. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev*. 1994;74(1):49–

94.

43. Joan Dawson M, Gadian DG, Wilkie DR. Muscular fatigue investigated by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Nature*. 1978;274(5674):861–6.
44. Balsom PD, Ekblom B, Sjöerlund K, Sjödén B, Hultman E. Creatine supplementation and dynamic high intensity intermittent exercise. *Scand J Med Sci Sports*. 1993;3(3):143–9.
45. Birch R, Noble D, Greenhaff PL. The influence of dietary creatine supplementation on performance during repeated bouts of maximal isokinetic cycling in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1994;69(3):268–70.
46. Peyrebrune MC, Nevill ME, Donaldson FJ, Cosford DJ. The effects of oral creatine supplementation on performance in single and repeated sprint swimming. *J Sports Sci*. 1998;16(3):271–9.
47. Coggan AR, Coyle EF. Carbohydrate ingestion during prolonged exercise: effects on metabolism and performance. *Exerc Sport Sci Rev*. 1991;19:1–40.
48. Bergström J, Hermansen L, Hultman E, Saltin B. Diet, Muscle Glycogen and Physical Performance. *Acta Physiol Scand*. 1967;71(2–3):140–50.
49. Baker LB, Rollo I, Stein KW, Jeukendrup AE. Acute effects of carbohydrate supplementation on intermittent sports performance. Vol. 7, *Nutrients*. 2015. p. 5733–63.
50. Walter G, Vandenborne K, Elliott M, Leigh JS. In vivo ATP synthesis rates in single human muscles during high intensity exercise. *J Physiol*. 1999;519 Pt 3:901–10.
51. Hintz CS, Chi MM, Fell RD, Ivy JL, Kaiser KK, Lowry C V, et al. Metabolite changes in individual rat muscle fibers during stimulation. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 1982;242(3):C218–28. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/content/242/3/C218.abstract>
52. Nassar-Gentina V, Passonneau J V, Vergara JL, Rapoport SI. Metabolic correlates of fatigue and of recovery from fatigue in single frog muscle fibers. *J Gen Physiol* [Internet]. 1978;72(5):593–606. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2228553&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

53. Kushmerick MJ, Meyer RA. Chemical changes in rat leg muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Am J Physiol* [Internet]. 1985;248(5 Pt 1):C542-9. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3993772
54. Dahlstedt AJ, Katz A, Tavi P, Westerblad H. Creatine kinase injection restores contractile function in creatine-kinase-deficient mouse skeletal muscle fibres. Vol. 547, *Journal of Physiology*. 2003. p. 395–403.
55. Fryer MW, West JM, Stephenson DG. Phosphate transport into the sarcoplasmic reticulum of skinned fibres from rat skeletal muscle. In: *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 1997. p. 161–7.
56. Duke AM, Steele DS. Mechanisms of reduced SR Ca(2+) release induced by inorganic phosphate in rat skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2001;281(2):C418-29. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11443041>
57. Dahlstedt AJ, Katz A, Westerblad H. Role of myoplasmic phosphate in contractile function of skeletal muscle: Studies on creatine kinase-deficient mice. *J Appl Physiol*. 2001;533(2):379–88.
58. Millar NC, Homsher E. The effect of phosphate and calcium on force generation in glycerinated rabbit skeletal muscle fibers. A steady-state and transient kinetic study. *J Biol Chem* [Internet]. 1990;265(33):20234–40. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243087>
59. Andrews M a, Godt RE, Nosek TM. Influence of physiological L(+)-lactate concentrations on contractility of skinned striated muscle fibers of rabbit. *J Appl Physiol*. 1996;80(6):2060–5.
60. Dutka TL, Lamb GD. Effect of lactate on depolarization-induced Ca(2+) release in mechanically skinned skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2000;278(3):C517-25. Available from:

<http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/abstract/278/3/C517>

61. Posterino GS, Dutka TL, Lamb GD. L(+)-lactate does not affect twitch and tetanic responses in mechanically skinned mammalian muscle fibres. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2001;442(2):197–203.
62. Chasiotis D, Sahlin K, Hultman E. Regulation of glycogenolysis in human muscle at rest and during exercise. *J Appl Physiol*. 1982;53(3):708–15.
63. Wilson JR, McCully KK, Mancini DM, Boden B, Chance B. Relationship of muscular fatigue to pH and diprotonated Pi in humans: a ³¹P-NMR study. *J Appl Physiol* [Internet]. 1988;64(6):2333–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3403417>
64. Metzger JM, Moss RL. Greater hydrogen ion-induced depression of tension and velocity in skinned single fibres of rat fast than slow muscles. *J Physiol*. 1987;393(1):727–42.
65. Fabiato A, Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol*. 1978;276(1):233–55.
66. Beck W, Bryant P, Lake M. Effect of intracellular pH on force development depends on temperature in intact skeletal muscle from mouse. *Am J Physiol* [Internet]. 1996;271(3 Pt 1):C878–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843718>
67. Pate E, Bhimani M, Franks-Skiba K, Cooke R. Reduced effect of pH on skinned rabbit psoas muscle mechanics at high temperatures: implications for fatigue. *J Physiol*. 1995;486(3):689–94.
68. Westerblad H, Bruton JD, Lännergren J. The effect of intracellular pH on contractile function of intact, single fibres of mouse muscle declines with increasing temperature. *J Physiol*. 1997;500(1):193–204.
69. Fitts RH. The Role of Acidosis in Fatigue : Pro Perspective. *Med Sci Sport Exerc*. 2016;48:2335–8.
70. Nelson CR, Debold EP, Fitts RH. Phosphate and acidosis act synergistically to

- depress peak power in rat muscle fibers. *AJP Cell Physiol* [Internet]. 2014;307(10):C939–50. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00206.2014>
71. Cheng AJ, Yamada T, Rassier DE, Andersson DC, Westerblad H, Lanner JT. Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. *J Physiol* [Internet]. 2016;594(18):5149–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/JP270650>
 72. Volllaard NBJ, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: Myths, realities and physiological relevance. *Sport Med*. 2005;35(12):1045–62.
 73. Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. *Arch Biochem Biophys*. 1986;246(2):589–601.
 74. Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol* [Internet]. 1998;509 (Pt 2(1998):565–75. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9575304
 75. Plant DR, Gregorevic P, Williams DA, Lynch GS. Redox modulation of maximum force production of fast-and slow-twitch skeletal muscles of rats and mice. *J Appl Physiol* [Internet]. 2001;90(3):832–8. Available from: <http://jap.physiology.org/content/90/3/832.abstract>
 76. Jendzjowsky NG, DeLorey DS. Acute superoxide scavenging reduces sympathetic vasoconstrictor responsiveness in short-term exercise-trained rats. *J Appl Physiol* [Internet]. 2013;114(11):1511–8. Available from: <http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/japplphysiol.00131.2013>
 77. Dulhunty AF. Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. Vol. 33, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006. p. 763–72.
 78. Stephenson DG, Lamb GD, Stephenson GMM. Events of the excitation-contraction-relaxation (E-C-R) cycle in fast- and slow-twitch mammalian muscle

- fibres relevant to muscle fatigue. In: *Acta Physiologica Scandinavica*. 1998. p. 229–45.
79. Juel C. Potassium and sodium shifts during in vitro isometric muscle contraction, and the time course of the ion-gradient recovery. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1986;406(5):458–63.
 80. Sjøgaard G, Adams RP, Saltin B, Sjøgaard G. Water and ion shifts in skeletal muscle of humans with intense dynamic knee extension. *Am J Physiol*. 1985;248(2 Pt 2):R190-6.
 81. Juel C. Muscle action potential propagation velocity changes during activity. *Muscle Nerve* [Internet]. 1988;11(7):714–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2457155>
 82. Balog EM, Fitts RH. Effects of fatiguing stimulation on intracellular Na⁺ and K⁺ in frog skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1996;81(2):679–85.
 83. Sejersted OM, Sjøgaard G. Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* [Internet]. 2000;80(4):1411–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015618>
 84. Juel C, Pilegaard H, Nielsen JJ, Bangsbo J. Interstitial K(+) in human skeletal muscle during and after dynamic graded exercise determined by microdialysis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2000;278(2):R400-6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2279011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744771%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2279011%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubm>
 85. Thompson L V, Balog EM, Riley D a, Fitts RH. Muscle fatigue in frog semitendinosus: alterations in contractile function. *Am J Physiol* [Internet]. 1992;262(6 Pt 1):C1500-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1535482>
 86. Fowles JR, Green HJ, Tupling R, O'Brien S, Roy BD. Human neuromuscular

- fatigue is associated with altered $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity following isometric exercise. *J Appl Physiol* [Internet]. 2002;92(4):1585–93. Available from: <http://jap.physiology.org/lookup/doi/10.1152/japplphysiol.00668.2001>
87. CLAUSEN T. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ Pump Regulation and Skeletal Muscle Contractility. *Physiol Rev* [Internet]. 2003;83(4):1269–324. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00011.2003>
 88. Medved I. N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *J Appl Physiol* [Internet]. 2004;97(4):1477–85. Available from: <http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/japplphysiol.00371.2004>
 89. McKenna MJ, Medved I, Goodman CA, Brown MJ, Bjorksten AR, Murphy KT, et al. N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na^+, K^+ -pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. *J Physiol* [Internet]. 2006;576(1):279–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1995650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115352>
 90. Kourie JJ. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol* [Internet]. 1998;275(1 Pt 1):C1–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3955>
 91. Garland SJ, Enoka RM, Serrano LP, Robinson GA. Behavior of motor units in human biceps brachii during a submaximal fatiguing contraction. *J Appl Physiol*. 1994;76(6):2411–9.
 92. Garland SJ, Garner SH, McComas AJ. Reduced voluntary electromyographic activity after fatiguing stimulation of human muscle. *J Physiol*. 1988;401(1):547–56.
 93. Garland SJ, McComas AJ. Reflex inhibition of human soleus muscle during fatigue. *J Physiol*. 1990;429(1):17–27.
 94. Woods JJ, Furbush F, Bigland-Ritchie B. Evidence for a fatigue-induced reflex inhibition of motoneuron firing rates. *J Neurophysiol*. 1987;58(1):125–37.

95. Kaufman MP, Rybicki KJ. Discharge properties of group III and IV muscle afferents: their responses to mechanical and metabolic stimuli. *Circ Res* [Internet]. 1987;61(4 Pt 2):I60-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3652404>
96. Kaufman MP, Hayes SG, Adreani CM, Pickar JG. Discharge properties of group III and IV muscle afferents. [Internet]. Vol. 508, *Advances in experimental medicine and biology*. 2002. p. 25–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12171119>
97. Sinoway LI, Hill JM, Pickar JG, Kaufman MP. Effects of contraction and lactic acid on the discharge of group III muscle afferents in cats. *J Neurophysiol*. 1993;69(4):1053–9.
98. Kaufman MP, Waldrop TG, Rybicki KJ, Ordway GA, Mitchell JH. Effects of static and rhythmic twitch contractions on the discharge of group III and IV muscle afferents. Vol. 18, *Cardiovascular Research*. 1984. p. 663–8.
99. Lagier-Tessonier F, Balzamo E, Jammes Y. Comparative effects of ischemia and acute hypoxemia on muscle afferents from tibialis anterior in cats. *Muscle Nerve*. 1993;16(2):135–41.
100. Mense S, Schmidt RF. Activation of group IV afferent units from muscle by algescic agents. *Brain Res*. 1974;72(2):305–10.
101. Garland SJ. Role of small diameter afferents in reflex inhibition during human muscle fatigue. *J Physiol*. 1991;435(1):547–58.
102. Millet GY, Lepers R. Alterations of Neuromuscular Function after Prolonged Running, Cycling and Skiing Exercises. *Sport Med*. 2004;34(2):105–16.
103. Amann M. Significance of Group III and IV muscle afferents for the endurance exercising human. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(9):831–5.
104. Amann M, Venturelli M, Ives SJ, McDaniel J, Layec G, Rossman MJ, et al. Peripheral fatigue limits endurance exercise via a sensory feedback-mediated reduction in spinal motoneuronal output. *J Appl Physiol* [Internet]. 2013;115(3):355–64. Available from:

- <http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/japplphysiol.00049.2013>
105. Davis JM, Bailey SP. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. In: *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1997. p. 45–57.
 106. Felipe V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol*. 2002;67(4):259–79.
 107. Yamamoto T, Azechi H, Board M. Essential role of excessive tryptophan and its neurometabolites in fatigue. *Can J Neurol Sci [Internet]*. 2012;39(1):40–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22384494>
 108. Cheng, I-Shiung, Wang, Yi-Wen, Chen I-Fan, Hsu Gi-Sheng, Hsueh C-F. The Supplementation of Branched-Chain Amino Acids, Arginine, and Citrulline...: EBSCOhost. *J Sport Sci Med [Internet]*. 2016;(January):509–15. Available from: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=852a3173-2204-4f1b-8fc1-cb5e94d2a7b9%40sessionmgr4007&vid=3&hid=4109>
 109. D’Amico JM, Butler AA, Héroux ME, Cotel F, Perrier JFM, Butler JE, et al. Human motoneurone excitability is depressed by activation of serotonin 1A receptors with buspirone. *J Physiol*. 2017;595(5):1763–73.
 110. Enoka RM, Duchateau J. Muscle fatigue : what , why and how it influences muscle function. 2008;1:11–23.
 111. Merton PA. Voluntary strength and fatigue. *J Physiol*. 1954;123(3):553–64.
 112. Gandevia SC, McKenzie DK. Activation of human muscles at short muscle lengths during maximal static efforts. *J Physiol*. 1988;407(1):599–613.
 113. Milioni F, Vieira LHP, Barbieri RA, Zagatto AM, Nordsborg NB, Barbieri FA, et al. Futsal Match-Related Fatigue Affects Running Performance and Neuromuscular Parameters but Not Finishing Kick Speed or Accuracy. *Front Physiol [Internet]*. 2016;7(November):518. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27872598>
 114. Vollestad N. Measurement of human muscle fatigue. *J Neusosci Metod*. 1997;74(2):219–27.

115. McCartney N, Heigenhauser GJ, Sargeant a J, Jones NL. A constant-velocity cycle ergometer for the study of dynamic muscle function. *J Appl Physiol*. 1983;55(1 Pt 1):212–7.
116. Perrine JJ, Edgerton VR. Muscle force-velocity and power-velocity relationships under isokinetic loading. [Internet]. Vol. 10, *Medicine and science in sports*. 1978. p. 159–66. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/723504>
117. Stauber WT, Barill ER, Stauber RE, Miller GR. Isotonic dynamometry for the assessment of power and fatigue in the knee extensor muscles of females. *Clin Physiol*. 2000;20(3):225–33.
118. Sargeant AJ, Hoinville E, Young A. Maximum leg force and power output during short-term dynamic exercise. *J Appl Physiol* [Internet]. 1981;51(5):1175–82. Available from: <http://jap.physiology.org/content/51/5/1175.short>
119. Beelen a, Sargeant a J. Effect of fatigue on maximal power output at different contraction velocities in humans. *J Appl Physiol*. 1991;71(6):2332–7.
120. Ryschon TW, Fowler MD, Wysong RE, Anthony A-R, Balaban RS. Efficiency of human skeletal muscle in vivo: comparison of isometric, concentric, and eccentric muscle action. *J Appl Physiol* [Internet]. 1997;83:867–74. Available from: <http://jap.physiology.org/content/83/3/867.abstract>
121. Gandevia SC, Enoka RM, McComas a J, Stuart DG, Thomas CK. Neurobiology of muscle fatigue. *Advances and issues. Adv Exp Med Biol* [Internet]. 1995;384:515–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672855>
122. Farina D, Holobar A, Merletti R, Enoka RM. Decoding the neural drive to muscles from the surface electromyogram. *Clin Neurophysiol* [Internet]. International Federation of Clinical Neurophysiology; 2010;121(10):1616–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2009.10.040>
123. Cifrek M, Medved V, Tonković S, Ostojić S. Surface EMG based muscle fatigue evaluation in biomechanics. *Clin Biomech*. 2009;24(4):327–40.
124. Masuda K, Masuda T, Sadoyama T, Mitsuharu Inaki, Katsuta S. Changes in

- surface EMG parameters during static and dynamic fatiguing contractions. *J Electromyogr Kinesiol.* 1999;9(1):39–46.
125. Hug F, Laplaud D, Lucia A, Grelot L. EMG threshold determination in eight lower limb muscles during cycling exercise: A pilot study. *Int J Sports Med.* 2006;27(6):456–62.
 126. De Luca CJ. Myoelectrical manifestations of localized muscular fatigue in humans. *Crit Rev Biomed Eng.* 1984;11(4):251–79.
 127. Finsterer J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. *BMC Musculoskeletal Disorders*; 2012;13(1):1. Available from: *BMC Musculoskeletal Disorders*
 128. Palacios G, Pedrero-Chamizo R, Palacios N, Maroto-Sánchez B, Aznar S, González-Gross M. Biomarkers of physical activity and exercise. Vol. 31, *Nutricion hospitalaria.* 2015. p. 237–44.
 129. BROOKS GA. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2000;32(4):790–9. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0005768-200004000-00011>
 130. Faude O, Kindermann W, Meyer T. Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sport Med* [Internet]. 2009;39(6):469–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19453206>
 131. Finsterer J, Drory VE. Wet, volatile, and dry biomarkers of exercise-induced muscle fatigue Pathophysiology of musculoskeletal disorders. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. *BMC Musculoskeletal Disorders*; 2016;17(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12891-016-0869-2>
 132. Sahlin K, Harris RC, Nylinde B, Hultman E. Lactate content and pH in muscle samples obtained after dynamic exercise. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 1976;367(2):143–9.
 133. Spriet LL, Lindinger MI, McKelvie RS, Heigenhauser GJ, Jones NL. Muscle glycogenolysis and H⁺ concentration during maximal intermittent cycling. *J*

- Appl Physiol. 1989;66(1):8–13.
134. Westerblad H, Allen DG, Lännergren J. Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol Sci* [Internet]. 2002;17(1):17–21. Available from: <http://physiologyonline.physiology.org/content/17/1/17.long%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821531>
 135. Allen DG. Skeletal muscle function: Role of ionic changes in fatigue, damage and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(8):485–93.
 136. VOLLESTAD NK, HALLEN J, SEJERSTED OM. Effect of Exercise Intensity on Potassium-Balance in Muscle and Blood of Man. *J Physiol*. 1994;475(2):359–68.
 137. Hallén J. K⁺ balance in humans during exercise. *Acta Physiol Scand*. 1996;156:279–86.
 138. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1243–76.
 139. Vecchiet J, Cipollone F, Falasca K, Mezzetti A, Pizzigallo E, Bucciarelli T, et al. Relationship between musculoskeletal symptoms and blood markers of oxidative stress in patients with chronic fatigue syndrome. *Neurosci Lett*. 2003;335(3):151–4.
 140. Deminice R, Sicchieri T, Payão PO, Jordão AA. Blood and salivary oxidative stress biomarkers following an acute session of resistance exercise in humans. *Int J Sports Med*. 2010;31(9):599–603.
 141. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002;30(6):620–50.
 142. Steinberg JG, Delliaux S, Jammes Y. Reliability of different blood indices to explore the oxidative stress in response to maximal cycling and static exercises. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2006;26(2):106–12.
 143. Uchiyama S, Tsukamoto H, Yoshimura S, Tamaki T. Relationship between

- oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2006;452(1):109–16.
144. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt L a. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*. 2005;19(2):276–85.
 145. Fontes EB, Smirmaul BPC, Nakamura FY, Pereira G, Okano AH, Altimari LR, et al. The relationship between rating of perceived exertion and muscle activity during exhaustive constant-load cycling. *Int J Sports Med*. 2010;31(10):683–8.
 146. Borg GAV. Borg -MSSE 1982 - Perceived_Exertion.pdf. *Med Sci Sports Exerc*. 1982;14(5):377–81.
 147. Borg G. Psychophysical scaling with applications in physical work and the perception of exertion. In: *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. 1990. p. 55–8.
 148. Millet GY, Martin V, Martin A, Vergès S. Electrical stimulation for testing neuromuscular function: From sport to pathology. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111(10):2489–500.
 149. Shield A, Zhou S. Activation with the Twitch Interpolation Technique. 2004;34(4):253–67.
 150. Schieppati M. The Hoffmann reflex: A means of assessing spinal reflex excitability and its descending control in man. Vol. 28, *Progress in Neurobiology*. 1987. p. 345–76.
 151. Hicks A, Fenton J, Garner S, McComas AJ. M wave potentiation during and after muscle activity. *J Appl Physiol [Internet]*. 1989;66(6):2606–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2745323>
 152. Raglin JS. Psychological Factors in Sport Performance The Mental Health Model Revisited. *Sport Med [Internet]*. 2001;31(12):875–90. Available from: <http://download.springer.com.ezproxy.library.wur.nl/static/pdf/704/art%253A10.2165%252F00007256-200131120-00004.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.216>

5%2F00007256-200131120-

00004&token2=exp=1494338180~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F704%2Fa

153. Lundby C, Robach P. Performance Enhancement: What Are the Physiological Limits? *Physiology* [Internet]. 2015;30(4):282–92. Available from: <http://physiologyonline.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physiol.00052.2014>
154. Marcora SM, Bosio A, de Morree HM. Locomotor muscle fatigue increases cardiorespiratory responses and reduces performance during intense cycling exercise independently from metabolic stress. *AJP Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2008;294(3):R874–83. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00678.2007>
155. Skurvydas A, Jascaninas J, Zachovajevs P. Changes in height of jump, maximal voluntary contraction force and low-frequency fatigue after 100 intermittent or continuous jumps with maximal intensity. *Acta Physiol Scand*. 2000;169(1):55–62.
156. De Morree HM, Marcora SM. Effects of isolated locomotor muscle fatigue on pacing and time trial performance. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(9):2371–80.
157. Perrey S, Racinais S, Saimouaa K, Girard O. Neural and muscular adjustments following repeated running sprints. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109(6):1027–36.
158. Girard O, Bishop DJ, Racinais S. Neuromuscular Adjustments of the Quadriceps Muscle after Repeated Cycling Sprints. *PLoS One*. 2013;8(5):1–9.
159. Froyd C, Millet GY, Noakes TD. The development of peripheral fatigue and short-term recovery during self-paced high-intensity exercise. *J Physiol*. 2013;591(5):1339–46.
160. Amann M, Proctor LT, Sebranek JJ, Pegelow DF, Dempsey JA. Opioid-mediated muscle afferents inhibit central motor drive and limit peripheral muscle fatigue development in humans. *J Physiol*. 2009;587(1):271–83.
161. Ahmed T. The effect of upper extremity fatigue on grip strength and passing accuracy in junior basketball players. *J Hum Kinet*. 2013;37(1):71–9.
162. Nuño A, Chiroso IJ, Van Den Tillaar R, Guisado R, Martín I, Martinez I, et al.

- Effects of fatigue on throwing performance in experienced team handball players. *J Hum Kinet.* 2016;54(1):103–13.
163. Dingwell JB, Joubert JE, Diefenthaler F, Trinity JD. Changes in Muscle Activity and Kinematics of Highly Trained Cyclists During Fatigue. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2010;55(11):2666–74.
 164. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971;122(4):532–5.
 165. Kovs IB, Mester E, Görög P. Stimulation of wound healing with laser beam in the rat. *Experientia.* 1974;30(11):1275–6.
 166. Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM, et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.* 1984;175(1):95–9.
 167. Karu T. Low intensity laser light action upon fibroblasts and lymphocytes. In: *Progress in laser therapy Selected papers from the October 1990 ILTA congress.* 1991. p. 175–9.
 168. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1999;49(1):1–17.
 169. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2005;23(4):355–61. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/pho.2005.23.355>
 170. Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, Tunér J, Ljunggren EA. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Aust J Physiother* [Internet]. 2003;49(2):107–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775206>
 171. Enwemeka CS. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(3):387–93.
 172. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):3–

9.

173. Huang YY, Nagata K, Tedford CE, Hamblin MR. Low-level laser therapy (810 nm) protects primary cortical neurons against excitotoxicity in vitro. *J Biophotonics*. 2014;7(8):656–64.
174. Barolet D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Semin Cutan Med Surg* [Internet]. Elsevier Inc.; 2008;27(4):227–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2008.08.003>
175. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD, Costa LOP, Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci. Lasers in Medical Science*; 2018;33(1):181–214.
176. Kim W-S, Calderhead RG. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Ther* [Internet]. 2011;20(3):205–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24155530> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3799034>
177. Chung H, Dai T, Sharma S, Huang Y, Carroll J, Hamblin M. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516–33.
178. Kneebone WJ. Practical applications of low level laser therapy. *Pract Pain Manag*. 2006;(December).
179. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation This paper is devoted to the memory of Prof. Lorenzo Bolognani who was one of the pio. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;140:344–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021>
180. Huang Y-Y, Chen AC-H, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. *Dose-Response* [Internet]. 2009;7(4):dose-response.0. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2203/dose-response.09-027.Hamblin>

181. Taroni P, Pifferi A, Torricelli A, Comelli D, Cubeddu R. In vivo absorption and scattering spectroscopy of biological tissues. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2003;2(2):124. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b209651j>
182. Laakso L, Richardson C, Cramond T. Factors affecting Low Level Laser Therapy. *Aust J Physiother*. 1993;39(2):95–9.
183. Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response* [Internet]. 2011;9(4):602–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3315174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
184. Jenkins PA, Carroll JD. How to Report Low-Level Laser Therapy (LLLT)/Photomedicine Dose and Beam Parameters in Clinical and Laboratory Studies. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2011;29(12):785–7. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2011.9895>
185. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29(February):179–84.
186. Costa MS, Pinfildi CE, Gomes HC, Liebano RE, Arias VE, Silveira TS, et al. Effect of low-level laser therapy with output power of 30 mW and 60 mW in the viability of a random skin flap. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):57–61.
187. Hode L, Tunér J. Wrong parameters can give just any results. *Lasers Surg Med*. 2006;38(4):343.
188. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with HeNe laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1995;27(3):219–23.
189. Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. *J Lasers Med Sci*. 2014;5(2):58–62.
190. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang YY, De Sousa MVP, Bagnato VS, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and

- ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol.* 2015;91(2):411–6.
191. Perini JL, Scotta Hentschke V, Sonza A, Dal Lago P. Long-term low-level laser therapy promotes an increase in maximal oxygen uptake and exercise performance in a dose-dependent manner in Wistar rats. *Lasers Med Sci.* 2016;31(2):241–8.
 192. Ferraresi C, de Sousa MVP, Huang YY, Bagnato VS, Parizotto NA, Hamblin MR. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci.* 2015;30(4):1259–67.
 193. de Lima Santos H, Rigos CF, Tedesco AC, Ciancaglini P. Biostimulation of Na,K-ATPase by low-energy laser irradiation (685 nm, 35 mW): Comparative effects in membrane, solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2007;89(1):22–8.
 194. De Lima FM, Moreira LM, Villaverde AB, Albertini R, Castro-Faria-Neto HC, Aimbire F. Low-level laser therapy (LLLT) acts as cAMP-elevating agent in acute respiratory distress syndrome. *Lasers Med Sci.* 2011;26(3):389–400.
 195. Wu JY, Chen CH, Wang CZ, Ho ML, Yeh ML, Wang YH. Low-Power Laser Irradiation Suppresses Inflammatory Response of Human Adipose-Derived Stem Cells by Modulating Intracellular Cyclic AMP Level and NF- κ B Activity. *PLoS One.* 2013;8(1):1–9.
 196. Karu TI, Pyatibrat L V., Kalendo GS. Biostimulation of HeLa cells by low-intensity visible light. V. Stimulation of cell proliferation in vitro by He-Ne Laser irradiation. *Nuovo Cim D.* 1987;9(12):1485–94.
 197. Santulli G, Marks AR. Essential roles of intracellular calcium release channels in muscle, brain, metabolism, and aging. *Curr Mol Pharmacol* [Internet]. 2015;8(2):206–22. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84937067295&partnerID=40&md5=6d81066a3997db72bfc51ffa27ca42c9>
 198. Wu ZH, Zhou Y, Chen JY, Zhou LW. Mitochondrial signaling for histamine

- releases in laser-irradiated RBL-2H3 mast cells. *Lasers Surg Med*. 2010;42(6):503–9.
199. Sharma SK, Kharkwal GB, Sajo M, Huang Y-Y, De Taboada L, McCarthy T, et al. Dose response effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons. *Lasers Surg Med* [Internet]. 2011;43(8):851–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lsm.21100>
 200. Chen AC-H, Arany PR, Huang Y-Y, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, et al. Low-Level Laser Therapy Activates NF-kB via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(7):e22453. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022453>
 201. Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res*. 2005;97(10):967–74.
 202. Popa-wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga A. ROS and Brain Diseases : The Good , the Bad , and the Ugly. 2013;2013(Figure 1).
 203. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* [Internet]. 2008;4(2):89–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3614697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 204. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):1–10.
 205. Huang Y, Nagata K, Tedford CE, McCarthy T, Hamblin MR. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. *J Biophotonics*. 2013;6(10):829–38.
 206. Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SKK, Barbeiro DF, Meneguzzo DT, et al. Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;97(3):145–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.09.002>

207. Correa F, Lopes Martins RAB, Correa JC, Iversen V V, Joenson J, Bjordal JM. Low-level laser therapy (GaAs $\lambda = 904$ nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(4):245–9.
208. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2013;15(5):R116. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4296>
209. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* [Internet]. 2003;32(3):239–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lsm.10126>
210. Hawkins D, Abrahamse H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(3):251–9.
211. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005;36(1):8–12.
212. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 1998;38(1):97–120. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97>
213. Prianti ACG, Silva JA, Dos Santos RF, Rosseti IB, Costa MS. Low-level laser therapy (LLLT) reduces the COX-2 mRNA expression in both subplantar and total brain tissues in the model of peripheral inflammation induced by administration of carrageenan. *Lasers Med Sci.* 2014;29(4):1397–403.
214. Rodrigues NC, Brunelli R, Abreu DCC, Fernandes K, Parizotto NA, Renno ACM. Morphological aspects and cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: An in vivo study. *Brazilian J Phys Ther.* 2014;18(5):395–401.

215. Albertini R, Aimbire F, Villaverde AB, Silva JA, Costa MS. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res*. 2007;56(6):228–9.
216. Bjordal JM. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations * Commentary. *Br J Sports Med* [Internet]. 2006;40(1):76–80. Available from: <http://bjsm.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjsm.2005.020842>
217. Takenori A, Ikuhiro M, Shogo U, Hiroe K, Junji S, Yasutaka T, et al. Immediate pain relief effect of low level laser therapy for sports injuries: Randomized, double-blind placebo clinical trial. *J Sci Med Sport* [Internet]. Sports Medicine Australia; 2016;19(12):980–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsams.2016.03.006>
218. Antunes F, Boveris A, Cadenas E. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004;101(48):16774–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=534717&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
219. Palacios-Callender M, Quintero M, Hollis VS, Springett RJ, Moncada S. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004;101(20):7630–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=419657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
220. Karu TI, Pyatibrat L V., Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med*. 2005;36(4):307–14.
221. Lohr NL, Keszler A, Pratt P, Bienengraber M, Warltier DC, Hogg N. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: Potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;47(2):256–63. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.009>

222. Zhang R, Mio Y, Pratt PF, Lohr N, Warltier DC, Whelan HT, et al. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;46(1):4–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.09.707>
223. Van Hove CE, Van Der Donckt C, Herman AG, Bult H, Franssen P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2009;158(3):920–30.
224. EHRREICH SJ, FURCHGOTT RF. Relaxation of Mammalian Smooth Muscles by Visible and Ultraviolet Radiation. *Nature* [Internet]. 1968;218(5142):682–4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/218682a0>
225. Chaudhry H, Lynch M, Schomacker K, Birngruber R, Gregory K, Kochevar I. Relaxation of vascular smooth muscle induced by low-power laser radiation. *Photochem Photobiol* [Internet]. 1993;58(5):661–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284321>
226. Mittermayr R, Osipov A, Piskernik C, Haindl S, Dangel P, Weber C, et al. Blue laser light increases perfusion of a skin flap via release of nitric oxide from hemoglobin. *Mol Med* [Internet]. 2007;13(1–2):22–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1869628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
227. Ihsan FRM. Low-Level Laser Therapy Accelerates Collateral Circulation and Enhances Microcirculation. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2005;23(3):289–94. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2005.23.289>
228. Larkin KA, Martin JS, Zeanah EH, True JM, Braith RW, Borsa PA. Limb blood flow after class 4 laser therapy. *J Athl Train*. 2012;47(2):178–83.
229. Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med*. 2000;27(5):427–37.

230. Da Ré Guerra F, Vieira CP, Oliveira LP, Marques PP, dos Santos Almeida M, Pimentel ER. Low-level laser therapy modulates pro-inflammatory cytokines after partial tenotomy. *Lasers Med Sci.* 2016;31(4):759–66.
231. Lopes-martins B, Marcos RL, Leonardo S, Prianti C, Muscara MN, Aimbire F, et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 2006;900:283–8.
232. De Almeida P, Lopes-Martins RÁB, De Marchi T, Tomazoni SS, Albertini R, Corrêa JCF, 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.* 2012;27(2):453–8.
233. Baroni BM, Leal Junior ECP, Geremia JM, Diefenthaler F, Vaz MA. Effect of light-emitting diodes therapy (LEDT) on knee extensor muscle fatigue. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(5):653–8.
234. Vassão PG, Toma RL, Antunes HKM, Tucci HT, Renno ACM. Effects of photobiomodulation on the fatigue level in elderly women: an isokinetic dynamometry evaluation. *Lasers Med Sci [Internet]. Lasers in Medical Science;* 2016;31(2):275–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-015-1858-7>
235. de Souza CG, Borges DT, de Brito Macedo L, Brasileiro JS. Low-level laser therapy reduces the fatigue index in the ankle plantar flexors of healthy subjects. *Lasers Med Sci [Internet]. Lasers in Medical Science;* 2016;31(9):1949–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2074-9>
236. da Silva Alves MA, Pinfildi CE, Neto LN, Lourenço RP, de Azevedo PHSM, Dourado VZ. Acute effects of low-level laser therapy on physiologic and electromyographic responses to the cardiopulmonary exercise testing in healthy untrained adults. *Lasers Med Sci.* 2014;29(6):1945–51.
237. Leal-Junior ECP, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho P de TC, Dal Corso S, Bjordal JM. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2015;30(2):925–39.

238. Rossato M, Dellagrana RA, Lanferdini FJ, Sakugawa RL, Lazzari CD, Baroni BM, et al. Effect of pre-exercise phototherapy applied with different cluster probe sizes on elbow flexor muscle fatigue. *Lasers Med Sci* [Internet]. *Lasers in Medical Science*; 2016;31(6):1237–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-1973-0>
239. Gusain, P.; Paliwal, R.; Joga, R.; Gupta, N.; Singh, V. Ancient light therapies: a boon to medical science. *Science and Culture*, v. 82, p. 231-236, 2016.
240. Grzybowski, A.; Sak, J.; Pawlikowski, J. A brief report on the history of phototherapy. *Clinics in Dermatology*, v. 34, p.532–537, 2016.
241. Roelandts, R. A new light on niels finsen, a century after his nobel prize. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, v.21, n.3, p. 115-7, 2005.
242. Grzybowski, A.; Pietrzak, K. From patient to discoverer--niels ryberg finsen (1860–1904) --the founder of phototherapy in dermatology. *Clin Dermatol.*, v. 30, n.4, p.451-5, 2012.
243. Barolet, D. Light-emitting diodes (leds) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.*, v.27, n.4, p.227-38, 2008.
244. Mester, E.; Szende, B.; Gärtner, P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol Radiother*, v.9, n.5, p. 621-6, 1968.
245. Mester, A.; Mester, A. The history of photobiomodulation: Endre Mester (1903-1984). *Photomed Laser Surg.*, v. 35, n.8, p.393-394, 2017.
246. Naményi, J.; Mester, E.; Foldes, I.; Tisza, s. Effect of laser irradiation and immunosuppressive treatment on survival of mouse skin allotransplants. *Acta Chir Acad Sci Hung*, v.16, p.327–335, 1975.

247. Goldman, J.A.; Muehlenbeck, E.C.; Muckerheide, M.C. Laser treatment of rheumatoid arthritis. *Electro/Optics Laser*, v.7, n.7. p.496-498, 1977.
248. Goldman, J.A.; Chiapella, J.; Casey, H.; Bass, N.; Graham, J.; McClatchey, W.; Dronavalli, R.V.; Brown, R.; Bennett, W.J.; Miller, S.B.; Wilson, C.H.; Pearson, B.; Haun, C.; Persinski, L.; Huey, H.; Muckerheide, M. Laser therapy of rheumatoid arthritis. *Lasers Surg Med.*, v.1, n.1, p.93-101, 1980.
249. Mg Guff, P.E.; Deterling Junior, R.A.; Gottlieb, L.S. Tumorcidal effects of laser energy on experimental and human malignant tumors. *The New England Journal of Medicine*, v.273, n.9, p. 490-492.
250. Dellagrana, R.A.; Rossato, M.; Sakugawa, R.L.; Baroni, B.M.; Diefenthaler, F. Photobiomodulation Therapy on Physiological and Performance Parameters During Running Tests: Dose-Response Effects. *J Strenght Cond Res*, v.32, n.10, p.20807-2815

8. ANEXOS

8.1. Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE PARÂMETROS DE ATIVIDADE MUSCULAR, TEMPO ATÉ A EXAUSTÃO EM ESFORÇO RETANGULAR NO DOMÍNIO SEVERO EM CICLO ERGÔMETRO E NOS ASPECTOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA FADIGA MUSCULAR.

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa e precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente este termo e em caso de dúvidas, fique inteiramente à vontade para perguntar ao responsável pelo estudo.

A finalidade deste estudo é investigar os efeitos do tratamento com LASER/LED terapêutico sobre o desempenho físico no ciclismo e em aspectos da fadiga do sistema muscular durante e após o exercício. Esse tipo de terapia, cientificamente chamada de “terapia de fotobiomodulação”, é comumente utilizada na área da fisioterapia para o tratamento de lesões e estudos recentes vêm demonstrando que ela também pode ser capaz de atrasar o surgimento da fadiga muscular durante a execução de exercícios e consequentemente, melhorar o desempenho. Em sua participação no projeto, você será submetido à realização da terapia de fotobiomodulação, realizará esforços máximos em bicicleta ergométrica com a monitorização da atividade dos seus músculos através de eletrodos colocados na pele, através da retirada de amostras de sangue do lóbulo da orelha e da veia do antebraço. Além disso, você também executará contrações máximas dos músculos da coxa com a aplicação de pequenos choques no nervo femoral, antes e após o exercício, com o objetivo de investigar aspectos relacionados à fadiga muscular.

LOCAL DAS AVALIAÇÕES E TRANSPORTE

Todas as avaliações deste projeto de pesquisa serão realizadas no Laboratório de Fisiologia e Desempenho Esportivo (LAFIDE) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Bauru, Departamento de Educação Física (DEF). Localizado na Avenida Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, Vargem Limpa, Bauru-SP. Caso você não seja aluno da UNESP e nem participe de projetos nesse Campus, as despesas de transporte até o laboratório serão custeadas pelo laboratório. Caso necessite de transporte público, você também poderá solicitar o ressarcimento dessas despesas.

CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Para que participe do estudo você deve ser um ciclista do sexo masculino, que pedala regularmente (30-60 min/dia, 3-5 vezes/semana, prática >4 meses), com um bom nível de aptidão física (mensurado através de um teste no laboratório, devendo atingir um consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) entre 40 a 55 $ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) e com idade entre 18 e 40 anos. Além disso, você não deve apresentar hábitos regulares de consumo de bebida alcoólica e tabagismo, doenças crônicas degenerativas ou cardíacas. Você também não poderá participar do estudo se apresentou algum tipo de lesão muscular e/ou articular nos últimos 3 meses, se fez a utilização de algum suplemento nutricional nesse mesmo período de tempo e se estiver realizando no período da pesquisa, algum tipo de tratamento medicamentoso e/ou fisioterapêutico.

CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Você poderá ser convidado a sair do estudo se vier a apresentar algum tipo de lesão na articulação, músculo ou tendão, assim como, qualquer doença que atrapalhe a sua capacidade de realizar exercício. Além disso, se você faltar consecutivamente aos testes, consumir bebidas alcoólicas nos dias que antecedem os testes, utilizar algum tipo de suplemento alimentar durante o período de estudo e/ou iniciar algum tratamento medicamentoso, você também será convidado a sair do estudo.

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Caso aceite participar do estudo, você terá que realizar 5 visitas ao laboratório durante um período aproximado de 15 dias para realizar os seguintes procedimentos:

Na primeira visita, seu peso e altura serão mensurados, depois, você realizará um exercício com incrementos de cargas a cada 2 minutos em uma bicicleta ergométrica até que você não consiga mais pedalar. Você realizará o exercício utilizando uma máscara que estará ligada a um aparelho que irá avaliar como está sua respiração durante o teste e também utilizará uma cinta na região do tórax que irá monitorar seus batimentos cardíacos. Após o teste, você irá descansar por alguns minutos e em seguida irá realizar um treino/familiarização do procedimento que irá avaliar a fadiga muscular (3 contrações máximas dos músculos da coxa com estimulação elétrica fraca próximo à virilha). Na segunda visita você irá realizar um exercício de ciclismo em alta intensidade até que não consiga sustentar uma determinada cadência para conhecer e se adaptar a esse tipo de atividade e ao final do exercício, irá realizar novamente um treino/familiarização do procedimento de avaliação da fadiga muscular. Na terceira, quarta e quinta visitas, você irá primeiramente realizar de forma efetiva o teste que avalia a fadiga muscular, depois será tratado com a terapia de fotobiomodulação, em seguida, realizará o mesmo exercício de alta intensidade na bicicleta realizado na segunda visita e após o exercício, realizará novamente o teste que avalia a fadiga muscular. Anteriormente ao procedimento de avaliação da fadiga muscular, você terá uma parte da coxa e do punho raspados com gilete, gentilmente abrasado (lixados) e limpos com álcool, para que eletrodos de avaliação sejam colocados nessa região. Além disso, você realizará uma avaliação de limiar de estimulação elétrica, onde serão aplicadas cargas elétricas em seu nervo próximo à virilha até que você indique seu limite de desconforto. Durante a realização dos exercícios, também serão realizadas coletas de pequenas quantidades de sangue (aproximadamente 1 gota) da orelha antes, durante e após o exercício e devido à isso, você poderá sentir uma ligeira dor no local da picada da agulha. Além disso, 1 mL de sangue será coletado da veia do seu braço através de um acesso venoso (semelhante ao que se usa para injetar soro na veia), em repouso, durante e 5 minutos após os exercícios na bicicleta e devido à isso, você poderá sentir um ligeiro desconforto no local aonde será inserido o acesso venoso. Todos os procedimentos serão realizados por um profissional capacitado e experiente, mas caso você venha a sentir qualquer tipo de desconforto e/ou mal estar que impeça de continuar as avaliações, você poderá pedir para parar os testes e os profissionais presentes no local trabalharão para fazê-lo se sentir melhor o mais rápido possível.

Todos os equipamentos que serão utilizados na coleta de material biológico serão descartáveis e esterilizados. Os materiais para a coleta de sangue serão descartados e

inutilizados após o uso individual. É importante salientar que todas as amostras de material biológico coletadas serão utilizadas exclusivamente na análise de dados do presente estudo e depois serão devidamente descartadas em local apropriado. Posteriormente, essas amostras biológicas serão recolhidas e descartadas de modo apropriado por empresa especializada prestadora de serviços para UNESP/Bauru, de forma que não será integrado a um banco de material biológico e não será utilizado para outro fim.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Os testes apresentam riscos inerentes à prática de exercícios físicos extenuantes. Apesar de raro, há possibilidade de alterações fisiológicas durante a realização de qualquer tipo de esforços máximos que podem ser respostas atípicas de pressão arterial, arritmias, desmaios, tonturas e em raríssimas situações ataque cardíaco. Portanto, profissionais qualificados estarão à disposição para tais eventualidades e caso alguma dessas alterações ocorram, o laboratório ficará responsável por total auxílio a você. Além disso, os procedimentos de estimulação elétrica e de inserção do acesso venoso podem gerar ligeiro incômodo e ansiedade.

Em benefício a sua participação no estudo, será emitido um relatório individual contendo índices da sua aptidão, tais quais, VO₂máx, iVO₂máx e limiares ventilatórios. Além de disso, será notificado dos aspectos mais importantes do estudo após sua conclusão e poderá inteirar-se do estado geral de sua condição física. Caso concorde em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei, somente o pesquisador, a equipe do estudo, você e os representantes do Comitê de Ética (caso necessário) terão acesso as suas informações para verificar as informações do estudo.

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para (14) 3103-6082 / Ramal 7620 (Prof. Dr. Alessandro Moura Zagatto). Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo ou eventual denúncias, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da UNESP Campus de Bauru através do número (14) 3103-6075 e/ ou email: aclaudamm@fc.unesp.br, localizado na Seção Técnica Acadêmica da Faculdade de Ciências da UNESP, localizada

na Av. Eng. Luís Edmundo Carrijo Coube, 14-01, Vargem Limpa, Bauru – SP, 17033-360.

Ressaltamos que sua participação no estudo é voluntária e não haverá recompensa financeira, podendo escolher não fazer parte do estudo ou desistir a qualquer momento. Você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito e não será proibido de participar de novos estudos. Caso sua integridade física e/ou moral for de alguma forma abalada durante a condução do estudo, você é livre para acionar a justiça e requerer qualquer tipo de indenização proveniente desses eventos. Serão geradas duas vias assinadas deste termo de consentimento, uma delas ficará com você e a outra ficará com o pesquisador responsável pelo estudo.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a tomar parte neste estudo.

Nome do Voluntário: _____ Data: _____ RG
ou CPF: _____ Telefone: _____
E-mail: _____

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador

8.2. Comprovante de aprovação pelo comitê de ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos efeitos da terapia de fotobiomodulação sobre parâmetros de atividade muscular, tempo até a exaustão em esforço retangular no domínio severo em ciclo ergômetro e nos aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular

Pesquisador: Alessandro Moura Zagatto

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 1

CAAE: 78657817.9.0000.5398

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.539.525

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa de pós-graduação Inter unidades em Ciências da Motricidade que pretende investigar os efeitos de duas doses de TFBM sobre parâmetros de atividade muscular e tempo até a exaustão em exercício retangular no domínio severo em ciclo ergômetro e nos aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos da pesquisa são: Geral: Investigar os efeitos de duas doses de TFBM sobre parâmetros de atividade muscular e tempo até a exaustão em exercício retangular no domínio severo em ciclo ergômetro e nos aspectos centrais e periféricos da fadiga muscular. Específicos: Avaliar os efeitos de duas doses de TFBM no tempo até à exaustão de um exercício reangular no domínio severo em ciclo ergômetro. Avaliar os efeitos de duas doses de TFBM na cinética das concentrações lactato e nível de pH sanguíneo, atividade elétrica e desconforto muscular durante exercício retangular no domínio severo até à exaustão em ciclo ergômetro. Avaliar os efeitos de duas doses de TFBM sobre os aspectos central e periférico da fadiga muscular após exercício no domínio severo até à exaustão em ciclo ergômetro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme descrito do TCLE, os testes apresentam riscos inerentes à prática de exercícios físicos

Endereço: Av. Luiz Edmundo Camilho Coube, nº 14-01
Bairro: CENTRO **CEP:** 17.033-360
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3103-9400 **Fax:** (14)3103-9400 **E-mail:** cepesquisa@frc.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.539.525

extenuantes, pois mesmo sendo raro, há possibilidade de alterações fisiológicas durante a realização de qualquer tipo de esforços máximos que podem ser respostas atípicas de pressão arterial, arritmias, desmaios, tonturas e em raríssimas situações ataque cardíaco. Porém, profissionais qualificados farão o acompanhamento do participante da pesquisa. Os riscos e benefícios estão detalhados claramente no TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto adequado às exigências acadêmicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado está adequado e apresenta o participante da pesquisa os objetivos do estudo; a possibilidade de participar ou não, podendo este desistir a qualquer momento; riscos e benefícios; etapas da coleta de dados; local de realização da coleta de dados; ou seja, todas as informações necessárias.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto e Termo do Consentimento Livre e Esclarecido adequados.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto considerado aprovado por estar em conformidade com os parâmetros legais, metodológicos e éticos analisados pelo colegiado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_990440.pdf	29/09/2017 12:20:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA_FINAL.pdf	29/09/2017 12:00:51	Yago Medeiros Dutra	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	29/09/2017 11:58:04	Yago Medeiros Dutra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	29/09/2017 11:41:04	Yago Medeiros Dutra	Aceito

Endereço: Av. Luiz Edmundo Carrijo Coube, nº 14-01
Bairro: CENTRO CEP: 17.033-360
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3103-9400 Fax: (14)3103-9400 E-mail: cepesquisa@fc.unesp.br