

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO
MOVIMENTO HUMANO**

**ANÁLISE METABÓLICA E MOLECULAR DA MUSCULATURA PÉLVICA DE
RATOS SUBMETIDOS AO DESUSO E TRATADO COM LED.**

Marco Aurélio Serafim Bonvino

2017

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARCO AURÉLIO SERAFIM BONVINO

ANÁLISE METABÓLICA E MOLECULAR DA MUSCULATURA
PÉLVICA DE RATOS SUBMETIDOS AO DESUSO E TRATADO COM
LED.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Ciências do Movimento Humano. Área de concentração: Biodinâmica. Linha de pesquisa: Fisiologia e Treinamento Desportivo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

PIRACICABA

2017

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecária: Marjory Harumi Barbosa Hito. CRB-8/9128

B723a	<p>Bonvino, Marco Aurélio Serafim Análise metabólica e molecular da musculatura pélvica de ratos submetidos ao desuso e tratados com led / Marco Aurélio Serafim Bonvino. – 2017. 64 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Prof. Me. Carlos Alberto Silva Dissertação (mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciências do Movimento Humano, Piracicaba, 2017.</p> <p>1. Imobilização - Pelve. I. Silva, Carlos Alberto. II. Título.</p> <p>CDU – 611.73</p>
-------	---

DEDICATÓRIA

*Dedico este estudo ao meu
querido avô Plínio Serafim, grande
incetivador desde minha infância.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida e de buscar novos desafios; à minha família e amigos que acreditaram e me apoiaram de alguma maneira.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, pela dedicação, atenção e paciência, servindo-me de inspiração nas suas orientações e conselhos, acreditando em mim e na minha pesquisa.

A todos meus amigos de mestrado, que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado.

Ao colega de profissão André Mascarin, que muito colaborou na fase de experimentação.

RESUMO

A cintura pélvica configura-se como uma importante estrutura que assegura a realização de atividades estáticas e dinâmicas, tanto do tronco quanto dos membros inferiores. Sendo assim, qualquer alteração nessa estrutura poderá acarretar em danos funcionais. Neste sentido, este estudo teve como objetivo aplicar um aparelho ortótico para promover a imobilização da cintura pélvica e avaliar o efeito do LED, enquanto estratégia de reabilitação. Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar (n=5 por grupo), distribuídos em cinco grupos, a saber; controle (C), imobilização pélvica (IP, 7 dias), controle + LED (CL, 630nm, 500 mW, 8-10 J/cm², 30-40s), imobilização pélvica + LED (IPL), remobilizados (R, avaliados após 7 dias da retirada da órtese). A intervenção foi realizada por 7 dias seguidos. As avaliações foram realizadas nos músculos glúteo máximo (GM), glúteo médio (GMe) e íliaco (I). Foram determinados o peso úmido do músculo glúteo máximo; a concentração plasmática de corticosterona (COR) e TNF- α ; relação proteína total/DNA (PT/DNA); reservas de glicogênio (GLI) e determinação da concentração dos receptores de insulina (IR), mTOR e AMPK. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA e teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de $p < 0,05$. Nos resultados obtidos não houve diferença na concentração de COR entre os grupos; a órtese promoveu redução nas reservas de GLI e na relação PT/DNA com maior intensidade no GM; o GLI não retornou a normalidade concomitante a remobilização; houve perda de peso no GM e a terapia com LED não promoveu melhora neste parâmetro; a IP promoveu redução na concentração de IR, mTOR e AMPK em todos os músculos avaliados; a aplicação do LED promoveu melhora significativa na condição de IP. Os dados indicam que a terapia de LED mostrou-se importante no processo de recuperação metabólica e minimizou a proteólise, além de reduzir a geração de TNF- α protegendo o músculo em desuso.

Palavras-Chave: Imobilização, Pelve, Ratos, Intervenção, Fisioterapia.

ABSTRACT

The pelvic girdle is an important structure that ensures static and dynamic activities, both in the trunk and in the lower limbs. Therefore, any change in this structure could result in functional damages. Objective: To apply an orthotic device to promote the immobilization of the pelvic girdle and evaluate the effect of LED as a rehabilitation strategy. Method: 30 Wistar rats ($n = 5$) were used, distributed in five groups, namely: Control (C), pelvic immobilization (IP, 7 days), control + LED (CL, 630nm, 500 mW, 8-10 J/cm², 30-40s), pelvic immobilization + LED (IPL), remobilized (R, evaluated after 7 days of orthosis removal). The intervention was performed for 7 consecutive days. The evaluations were performed in the gluteus maximus (GM), gluteus maximus (GMe) and iliac (I) muscles. The wet weight of the gluteus maximus muscle was determined; The plasma concentration of corticosterone (COR) and TNF- α , total protein/DNA ratio (PT/DNA), glycogen reserves (GLY) and determination of insulin receptor (IR) concentration, mTOR and AMPK. Data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test followed by ANOVA and Tukey's test. A critical level of $p < 0.05$ was set in all calculations. Results: there was no difference in the concentration of COR between the groups; The orthosis promoted reduction of GLI reserves and PT / DNA ratio with greater intensity in GM; The GLI did not return to normality concomitant to remobilization; There was weight loss in GM and LED therapy did not improve this parameter; IP promoted a reduction in the concentration of IR, mTOR and AMPK in all muscles evaluated; The application of the LED promoted a significant improvement in the IP condition. Conclusion: Data indicate that LED therapy has been shown to be important in the metabolic recovery process and has minimized proteolysis in addition to reducing the generation of TNF- α by protecting disuse skeletal muscle.

Key words: Immobilization, Pelvis, Rats, Intervention, Physiotherapy

LISTA DE ABREVIATURAS

AGP – Guanina trifosfato

Akt - Proteína serina/treonina quinase ou proteína quinase B

AMPK – proteína quinase ativada por AMP

ANOVA - Análise de variância

APKc – proteína quinase atípica C

AS 160 – substrato de Akt

ATP – Adenosina trifosfato

ATPase – classe de enzimas que catalisam a decomposição do trifosfato de adenosina (ATP) em adenosina difosfato (ADP)

C – Controle

Cbl – protooncogenese

CL – Controle + LED

COR – corticosterona

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPC – dor pélvica crônica

dpm - Desvio padrão da média

DTT – Ditioneitol, pequena molécula redutora

epm - Erro padrão da média

Gab – 1 – substrato de receptor de insulina

GDP - Guanina difosfato

GLI – reservas de glicogênio

GLUT 4 - Proteína transportadora de glicose tipo 4

GM – músculo Glúteo Máximo

Gme – músculo Glúteo Médio

Grb2 - Proteína ligante do receptor do fator de crescimento 2

I – músculo Ilíaco

IL – Imobilização pélvica + LED

IR - Receptor de insulina

IRS - Substrato do receptor de insulina

JAK 2 – substrato de receptor de insulina

KOH - Hidróxido de Potássio

LED - Light Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz)

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

mg – Miligrama

mg/kg - Miligramas por kilograma

mg/mg - Miligrama por miligrama

mL - Mililitros

mM - Milimol

mMol/g - Milimol por grama

ms - Milisegundo

mTOR - Enzima alvo da rapamicina

MuRF-1 - Muscle ring finger protein-1

P60dok – substrato de receptor de insulina

PGC 1 – co-ativador de transcrição gênica

PHAS1 – proteína mediadora da ação de insulina

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

PT – proteína total

R – Remobilizados

Ras - Subtipo monomérico de proteína ligante de nucleotídeos de guanina

RG – reservas glicogênicas

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro

rpm - Rotação por minuto

SH2 - Domínio 2 homólogo a Src

Shc - Proteína adaptadora de ligação a fosfotirosina contendo SH2

SOS - Fator de troca do nucleotídeo guanina

Src2- Família de proteínas tirosina quinase

TNF alfa – fator de necrose tumoral

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Distribuição dos ratos em grupos experimentais (n=5)..... 24.

Tabela 2. Porcentagem do tipo de fibra dos músculos Glúteo máximo (GM), glúteo médio (Gmed) e Ilíaco (I)..... 28.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dispositivo de imobilização pélvica aplicado no corpo do rato..... 26.

Figura 2: Aplicação do LED após tricotomização..... 27.

Figura 3: Concentração plasmática de corticosterona ($\mu\text{g/mL}$) dos grupos controle (C) e imobilização pélvica (IP). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5..... 31.

Figura 4: Concentração de glicogênio (mg/100mg) nos músculos glúteo máximo (GM), glúteo médio (GMe) e Ilíaco (I) nas condições controle (C), imobilização pélvica (IP) e Remobilizado (R). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado..... 32.

Figura 5: Relação proteína total/DNA (mg/100mg) nos músculos glúteo máximo (GM), glúteo médio (GMe) e Ilíaco (I) nas condições controle (C), imobilização pélvica (IP) e Remobilizado (R). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado..... 33.

Figura 6: Concentração de glicogênio (mg/100mg) nos músculos glúteo máximo (GM), glúteo médio (GMe) e Ilíaco (I) nas condições controle (C), imobilização pélvica (IP) e imobilização pélvica tratado com LED (IPL). Os valores correspondem

à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado..... 34.

Figura 7: Peso (mg) do músculo glúteo máximo nas condições controle (C), imobilizados com a órtese (IP), controle tratado com LED (CL) e imobilizado tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle.....35.

Figura 8: Porcentagem de fosforilação do receptor de insulina nos músculos glúteo máximo (A), glúteo médio (B) e íliaco (C) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP), controle tratado com LED (CL) e imobilização pélvica tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilização pélvica, ~ p<0,05 comparado ao CL.....36.

Figura 9: Porcentagem de fosforilação do receptor da enzima mTOR nos músculos glúteo máximo (A), glúteo médio (B) e íliaco (C) dos grupos dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP), controle tratado com LED (CL) e imobilização pélvica tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado à imobilização pélvica, ~ p<0,05 comparado ao CL..... 38.

Figura 10: Porcentagem de fosforilação do receptor da enzima AMPK nos músculos glúteo máximo (A), glúteo médio (B) e íliaco (C) dos grupos controle (C), imobilizados (I), controle tratado com LED (CL) e imobilizado tratado com LED (ILP). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado, ~ p<0,05 comparado ao tratado com LED..... 39.

Figura 11: Concentração plasmática de TNF- α em unidades arbitrárias dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP), controle tratado com LED (CL) e imobilização pélvica tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média

± dp, n=3. *p < 0,05 comparado ao controle, #p<005 comparado ao grupo
imobilização pélvica..... 40.

SÚMARIO

INTRODUÇÃO.....	14
HIPÓTESE.....	23
OBJETIVO GERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXO APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	64.

INTRODUÇÃO

O tecido muscular tem como função principal produzir força e causar movimentos, os quais são responsáveis pela manutenção e mudanças na postura, e pela locomoção do organismo (Lieber, 2004; Aires, 2015).

Através de métodos histoquímicos e morfológicos foram descritas as estruturas que compõem as fibras musculares, revelando a presença de filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina dispostos longitudinalmente nas miofibrilas e organizados em uma disposição simétrica e paralela. (Rui e Procópio, 2015).

Basicamente classificam-se as fibras musculares em tipo I ou II. As identificadas como do tipo I, vermelhas ou fibras lentas, geram energia predominantemente por meio do sistema aeróbio, possuem numerosas mitocôndrias, grande quantidade de mioglobina, baixa atividade da miosina ATPase e velocidade de contração reduzida. As fibras do tipo II, ou fibras rápidas, possuem uma maior atividade da miosina ATPase, alta velocidade de liberação e captação de cálcio, baixo número de mitocôndria e mioglobina, gerando energia predominantemente através do sistema anaeróbio (Zierath e Hawley, 2004).

O equilíbrio homeostático/energético das fibras musculares é controlado tanto pelo sistema nervoso, através do comando neuromuscular, quanto pela sensibilidade do tecido a ação de hormônios com expressiva atividade anabólica, merecendo destaque a sensibilidade insulínica (Ropele et al., 2005).

A sinalização intracelular da insulina inicia-se pela ligação ao receptor de membrana, que é um arranjo proteico heterotetramérico com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β . Neste receptor, a insulina liga-se na subunidade α ativa a subunidade β que se fosforila e ativa vários

substratos proteicos presentes no citosol, que pertencem à família das IRS (substratos do receptor da insulina). A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), tais como, a fosfatidilinositol 3 quinase (PI 3-quinase) e outros substratos como a Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 (Carvalheira et al., 2002b; Saad et al., 1995).

Atualmente, a PI 3-quinase é a principal molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose. As proteínas alvo conhecidas desta enzima são a Akt e as isoformas atípicas da APKc. (Carvalheira et al., 2002a). A Akt apresenta três isoformas já bem definidas e descritas como Akt1, Akt2, Akt3, sendo a Akt2 a mais frequente no músculo esquelético (Sue et al., 2001).

Importante salientar que o substrato de Akt denominado de AS160 participa da translocação do GLUT4 de vesículas citosólicas em direção a membrana promovendo elevação na população deste transportador. Por sua vez, a literatura mostra que o GLUT 4 também pode ser translocado para a membrana por vias independentes da insulina, como ocorre durante a contração muscular (Huang, Czech, 2007; Schiaffino, Mammucari, 2012).

A insulina também estimula a enzima *mitogen-activated protein* (MAP) quinase, que é uma importante via sinalizadora iniciada com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras ativando-a. Uma vez ativada, a Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares. A insulina aumenta a síntese e bloqueia a degradação de proteínas através da ativação da mTOR. A mTOR controla a translação de proteínas diretamente através da fosforilação da p70-ribossomal S6 quinase (p70^{rs6k}), que ativa a síntese ribossomal de proteínas

através da fosforilação da proteína. A mTOR também fosforila a PHAS1, que aumenta a síntese proteica via aumento da translação de proteínas (Hirabara et al., 2012). Muitas condições podem levar a um comprometimento funcional da cintura pélvica, sendo que esse comprometimento pode ser induzido e potencializado por fraturas, tumores, fraqueza muscular, alterações da coluna vertebral, restrição ao leite, problemas vesicais e outras situações que culminam em hipotatividade ou mesmo no desuso. Nesse ínterim, a cintura pélvica configura-se como uma importante estrutura que desempenha função estática e dinâmica, sendo que esta estrutura também constitui o suporte do abdome, além de conformar a união entre os membros inferiores e o tronco (Barbosa et al., 2013).

Assim, a cintura pélvica humana é estruturada como um anel ósteo-articular fechado, composto por três estruturas ósseas e três articulações. As três estruturas ósseas são dois ossos coxais simétricos, articulados pelo sacro, que é um osso ímpar e simétrico formado pela fusão de cinco vértebras. Nesse ínterim, têm-se ainda três articulações, de pouca mobilidade, sendo duas articulações sacroilíacas e uma sínfise púbica (Kapandji, 2000; Dangelo; Fattini, 2008).

Haja vista a importância e complexidade da cintura pélvica, equipes de socorro e cirurgiões do trauma destacam a importância de se utilizar primeiramente a imobilização enquanto recurso terapêutico, independentemente da ocorrência ou não de fraturas. No que diz respeito às estatísticas que envolvem fraturas de cintura pélvica, destaca-se que nos EUA, das 120.000 fraturas pélvicas reportadas no período de um ano, 21.000 eram fraturas do anel pélvico (Bottlang et al., 2002).

Convém ressaltar que fratura, é apenas uma das diversas condições que podem levar a imobilização da cintura pélvica. Dessa forma, o estudo de Simpson et al., (2002), pontua que a taxa de mortalidade causada por fraturas do anel pélvico é

maior que 25%, sendo que a combinação de uma fratura do anel pélvico com outros ferimentos torna a taxa de mortalidade duas ou três vezes maior. Outro agravante nesse tipo de fratura é a hemorragia que se pode ter, uma vez que a cintura pélvica comporta órgãos altamente vascularizados.

Nos grandes centros americanos e europeus, a incidência de fratura de pelve é de aproximadamente 23 para cada 100.000 habitantes, sendo que a mortalidade geral varia de 4 a 23% (Balogh et al., 2007; Hauschild et al., 2008).

Estima-se que 10% das fraturas pélvicas podem ser classificadas como "complexas", haja vista que podem apresentar instabilidade mecânica, hemodinâmica, além da presença de lesões em outros segmentos corporais (Gänsslen, Giannoudis e Pape, 2003).

Outros estudos apontam que nos casos de fratura pélvica, até 60% das mortes ocorrem no local do acidente. Nessa linhagem, presume-se que a hemorragia retroperitoneal associada à fratura de pelve, corresponda de 7 a 33% dos óbitos (Tötterman et al., 2007; Hauschild et al., 2008).

Dentre as inúmeras condições que podem comprometer a cintura pélvica, tem-se a dor pélvica crônica (DPC), podendo ser uma dor cíclica ou não cíclica, de duração igual ou superior a seis meses, não associada a menstruação ou relação sexual (Montenegro et al., 2008).

A DPC pode ser resultante de uma complexa interação entre os sistemas gastrointestinal, urinário, ginecológico, musculoesquelético, neurológico, psicológico, endócrino, e fatores socioculturais. Destaca-se ainda que sua prevalência é em torno de 3,8% em mulheres de 15 a 73 anos, fato este que faz da DPC uma condição mais prevalente que à enxaqueca, asma e dor nas costas (Nogueira, Reis e Poli Neto, 2006).

Sabe-se que a DPC atinge de 14 a 24% das mulheres em idade reprodutiva, de modo que isso pode se refletir diretamente na vida conjugal, social e profissional, fato este que faz da DPC um sério problema de saúde pública (Howard, 2003; Nogueira, Reis e Poli Neto, 2006).

Devido a escassez de estudos científicos no Brasil, não se tem uma quantificação de no que diz respeito à prevalência de DPC. No entanto, no Reino Unido a prevalência é de 25%, e nos Estados Unidos de 14,7%. Muito embora no Brasil não se tenha valores, acredita-se que a prevalência possa ser maior em países em desenvolvimento (Cury, Coelho e Abrão, 2004; Miranda, Schor e Girão, 2009).

Um fato importante a ser mencionado, é que cerca de 80% da população brasileira, em algum momento da vida, já apresentaram queixa de dores na coluna vertebral, principalmente na região lombo-sacra. Nesse ínterim, a incidência e a prevalência de dor nessa região direcionam os estudos para uma classe de desordens epidêmicas, sociais e que podem ter grandes proporções econômicas, haja vista que é a queixa mais reiterada nos serviços de saúde, sendo a desordem lombo-sacra como a principal causa de afastamento do trabalho, além de ser de alto custo para o sistema previdenciário (Schmidt, Kohlmann, 2005).

O estudo sobre dor pélvica crônica (DPC) realizado por Miranda, Schor e Girão, (2009), expõe que a queixa de algia na região lombo-sacra associada ao anel pélvico, estava associada em 50% das integrantes do grupo DPC e ainda, acometeu 37,8% das integrantes do grupo controle (sem DPC). Assim, chama-se a atenção para o aspecto restritivo que essa algia pode causar quando se trata de cintura pélvica e mobilidade.

Hodges e Richardson, (1996), atestaram que indivíduos com dor na região lombo-sacra, em geral apresentam deficiência significativa de controle motor associada, com maior efeito no mecanismo de contração do músculo transverso do abdome. Dessa forma, o aparelho locomotor desenvolve maior tensão na musculatura intervertebral, no intuito de compensar o desequilíbrio. Assim, o desequilíbrio muscular pode ser configurado como mais uma desordem funcional que acomete a cintura pélvica e coluna vertebral.

O desequilíbrio muscular apresenta íntima relação com a flexibilidade, que com o passar dos anos tende a reduzir, principalmente pela degradação dos tecidos conjuntivos periarticulares. Assim, Feland et al., (2001), apontam que a cintura pélvica e sua correlação funcional com a coluna vertebral e membros inferiores pode sofrer alterações, sendo que isso ainda é pouco elucidado.

Especialmente em pessoas idosas, o desempenho da marcha pode ser limitado pela pouca flexibilidade das estruturas correlacionadas a cintura pélvica. Nesse contexto, qualquer desequilíbrio muscular pode alterar o posicionamento pélvico e conseqüentemente sua biomecânica. Tal fato além de causar instabilidade, pode ainda alterar o centro de gravidade e culminar em complicações como as quedas (Kerrigan et al., 2003; Cristopoliski, 2008).

O estudo de McManus e Grill, (2011) atestou que após 40 dias de lesão medular em modelo experimental animal, houve redução de 13% na massa óssea pélvica, de modo que essa redução foi categorizada como osteoporose. É importante salientar que a lesão nervosa não corresponde à maioria das disfunções pélvicas, que em geral são causadas por desequilíbrios musculares, hipoatividade e imobilização.

Sabe-se que os efeitos do desuso pode ser observado horas após a aplicação dessa terapêutica. Dessa forma, nota-se redução das reservas de glicogênio, degradação de proteínas, diminuição da sinalização insulínica, redução da atividade mitocondrial, redução do controle motor, aumento de fibras colágenas que podem ser favoráveis à fibrose, hipotrofia e atrofia muscular, proteólise, além de uma série de alterações catabólicas (Slimani et al., 2012).

Estudos mais aplicados sobre o desuso e expressão gênica, estabelecem uma relação de tempo e expressão gênica, de modo que independentemente da idade, os níveis de mRNA, a expressão de MuRF-1, bem como atrogina-1, mostraram-se em elevação na fase inicial (2-4 dias) da atrofia por desuso muscular humano. Da mesma forma houve uma redução acentuada no PGC-1 α e PGC-1 β (1-4 dias), associada à diminuição de 10% no tamanho da fibra muscular (Suetta et al., 2013).

Com base nos achados pela pesquisa experimental em ratos, nota-se que a comunidade científica tem empenhado esforço em estudar estratégias de estudo do desuso muscular, seja por meio de modelos não invasivos ou mesmo modelos altamente invasivos e de difícil desenvolvimento (Arruda et al., 2008).

Nota-se ainda que tem-se modelos de desuso já bem estabelecidos para tornozelo e também para a escoliose experimental. No entanto, não se encontra na literatura um modelo de estudo para desuso da cintura pélvica, fato este que encoraja essa premissa do presente projeto (Silva et al., 2006; Silva et al., 2012).

A fisioterapia ortopédica tem atuação na prevenção e tratamento das patologias dos ossos, músculos, articulações e ligamentos. Engloba reabilitação de pós-fraturas, entorses, luxações, traumas ou contusões musculares, amputações, distúrbios mecânicos da coluna vertebral, pós cirurgias, dentre outras, utilizando

recursos objetivando alívio de quadro álgico, eliminação de processo inflamatório, melhora na circulação sanguínea, fortalecimento muscular, recuperação de movimentos, equilíbrio, propriocepção e reeducação postural

É de suma importância o tratamento fisioterapêutico na fase pós-imobilização do quadril. A imobilização pode apresentar alguns fatores limitantes, entre os principais estão: a atrofia muscular, diminuição de amplitude de movimentos e possíveis alterações circulatórias. A aplicação de variadas técnicas promove uma satisfatória reabilitação, minimizando e prevenindo possíveis complicações, implicando assim, no resultado almejado. O tratamento engloba desde alongamentos, exercícios ativos e fortalecimento, até hidroterapia e treino de marcha. Todos os recursos são aplicados de acordo com a necessidade específica do paciente, sendo aumentados ou modificados periodicamente, até que o paciente se recupere completamente e volte a ter uma vida normal (Lee, 2001).

Recentemente tem sido discutido a importância da terapia com o uso de luz (fototerapia), mais especificamente com o uso de LED (*light-emitting diode* – diodo emissor de luz), ou LEDterapia. O LED é um emissor de luz não-coerente e em comparação ao laser, emite luz numa potência pico menor no mesmo comprimento de onda; não tem efeito térmico; tem menor gasto de energia. Já foi demonstrado que a LEDterapia está associada com aceleração na cicatrização de feridas, melhora na recuperação de lesão por isquemia no coração e degeneração atenuada do nervo óptico lesionado (Whelan, 2001; Zhang, 2009).

Atribuem-se parte dos efeitos do LED à estimulação na função mitocondrial que foi constatado em diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*. O LED é capaz de estimular o aumento na função mitocondrial por aumentar o consumo de oxigênio, a produção de ATP, o transporte de elétrons, e por reduzir a formação de ROS31 e

por reduzir a ativação de vias inflamatórias. Esses efeitos parecem ser mediados pelo aumento da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, à cadeia de transporte de elétrons, síntese de ATP, além de genes antioxidantes e anti-inflamatórios, e por aumentar a atividade da citocromo C oxidase, uma enzima chave da cadeia transportadora de elétrons. (Barolet, 2008; Liang, 2006; Begum, et al., 2013; Liang et al., 2008).

Essas observações sugerem que a LEDterapia pode se apresentar como uma abordagem terapêutica inovadora e não-invasiva para o tratamento de processos patológicos nos quais a disfunção mitocondrial tem papel central, como pode ser o caso da atrofia muscular.

HIPÓTESE

Mediante o exposto, a hipótese do estudo é que o tratamento de músculos submetidos a imobilização com terapia de LED pode minimizar os efeitos deletérios causados pelo desuso.

OBJETIVO GERAL:

O presente estudo tem como objetivo avaliar se o tratamento com LED pode ser uma possibilidade estratégica na recuperação da musculatura da cintura pélvica após imobilização.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a concentração plasmática de corticosterona.
- Avaliar a concentração muscular de glicogênio no Glúteo máximo, Glúteo médio e Ilíaco, nas diferentes condições experimentais.
- Avaliar a relação proteína total/DNA nos músculos, Glúteo máximo, Glúteo médio e Ilíaco.
- Avaliar o peso do músculo Glúteo máximo.
- Avaliar a concentração de receptores de insulina, das enzimas AMPK e mTOR, nas diferentes condições experimentais.
- Avaliar a concentração plasmática de TNF- α .

MATERIAL e MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com 3 a 4 meses de idade pesando de 180 a 200 gramas adquiridos junto a empresa ANILAB (Paulínia), os quais receberam água e alimentação *ad libitum*, sendo mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6 horas, e mantidos em gaiolas coletivas contendo 4 animais. Antes de iniciar o período experimental, os animais permaneceram por 48 horas em adaptação às condições do biotério de pesquisa, haja vista que após esse período serão distribuídos em 5 grupos, conforme tabela 1. Estudo aprovado pela CEUA/UNIMEP – Protocolo 05/2014 – ADENDO (anexo).

Tabela 1: Distribuição dos ratos em grupos experimentais (n=5).

Grupos
Controle - C
Tratado com LED – CL
Imobilização Pélvica - IP
Imobilizados tratados com LED - IPL
Remobilizado (analisado 7 dias após a retirada da órtese) - R

IMOBILIZAÇÃO

A partir de um estudo anatômico nos ratos envolvendo posição dos membros e a biomecânica, foi desenvolvido um dispositivo ortótico não invasivo que assegurou a imobilização da cintura pélvica através de coletes de policloreto de polivinila (PVC), assim utilizou-se dois coletes (escapular e pélvico) ligados a estrutura de suspensão desenvolvida com acrílico, rodas de plástico, arame fino, parafuso e porcas. Na descrição do modelo pode-se observar que o processo de imobilização pélvica consiste em um sistema de suspensão da cintura posterior (pélvica) e membros pélvicos posteriores, de modo que, as rodas favorecem a mobilidade, ao mesmo tempo em que restringe a ação da musculatura envolvida.

Destaca-se ainda, que o dispositivo leva em conta o não comprometimento da micção e defecação do animal, haja vista que é ajustado em formato de cinta abdominal, cujo fechamento e regulação da pressão fica localizado na região dorsal do corpo de animal, conforme mostra a figura 1. A locomoção foi assegurada pela adaptação das rodas na lateral do dispositivo, uma vez que as mesmas foram colocadas em angulação de 45º em relação ao solo, impedindo que o dispositivo virasse e o animal pudesse sofrer alterações na coluna.

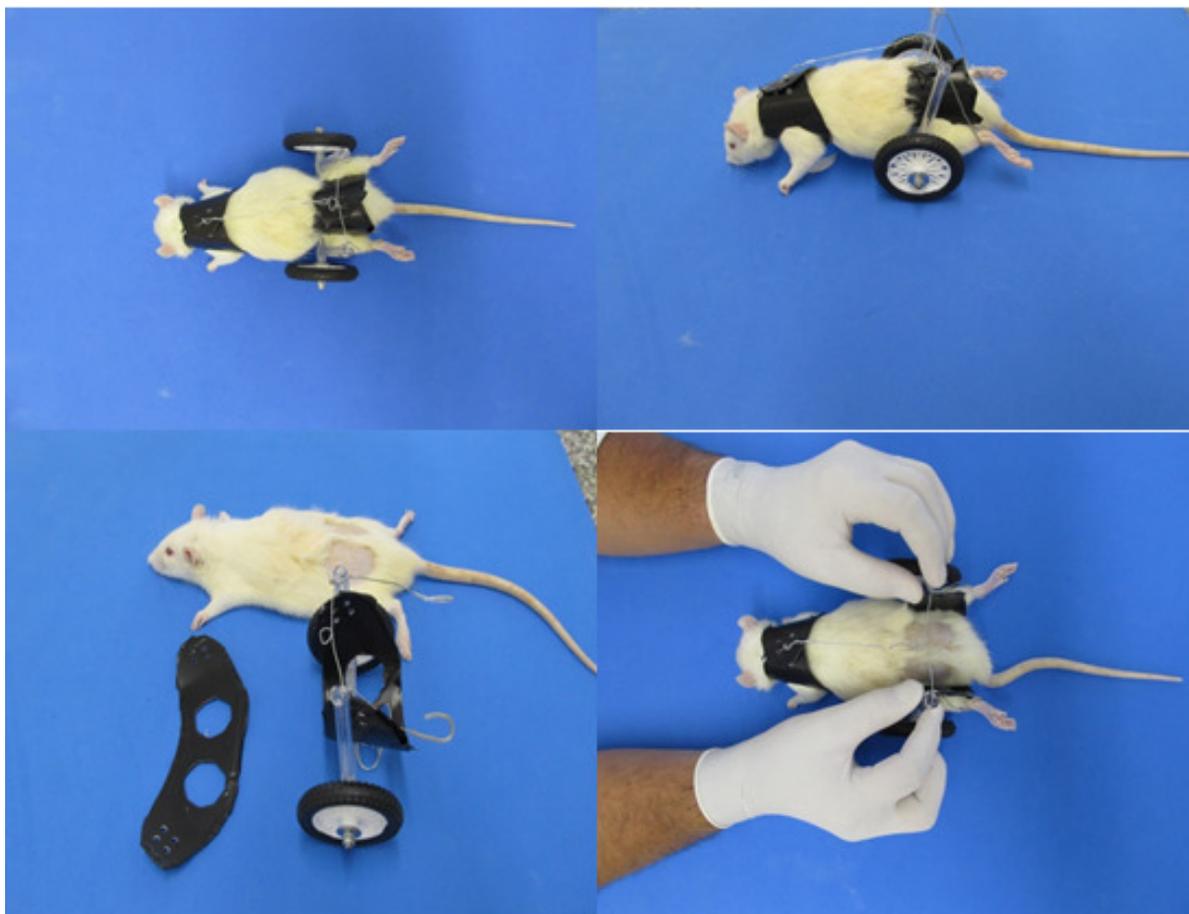


Figura 1: Dispositivo de imobilização pélvica aplicado no corpo do rato.

TRATAMENTO COM LED:

Foi utilizado na terapia a aplicação diária do recurso (LED) durante 7 dias com emissão de 630nm, potência 500 mW e densidade de energia de 8-10 J/cm² equivalente a 30-40s de aplicação no tecido muscular (MANUAL BIOS) como descrito por Fiório et al., (2011) e representado na figura 2. A terapia foi aplicada em toda área pélvica que se refere a posição ocupada pela área do músculo glúteo máximo, neste contexto, enquanto um pesquisador fez a contenção do animal, o outro pesquisador aplicou a terapia conforme pode ser visualizado na figura 2.



Figura 2: Aplicação do LED após tricotomização

AMOSTRAGEM

Para amostragem, os animais foram decapitados, o sangue coletado e acondicionado em tubos de ensaio para isolamento do plasma sendo prontamente direcionado a avaliação da concentração plasmática de corticosterona e da citocina TNF- α .

A seguir, foram coletadas amostras dos músculos glúteo máximo, glúteo médio e lílaco, cujas tipagem de fibras estão descritas na tabela 2. As amostras foram separadas em alíquotas e submetidas à avaliação das reservas glicogênicas a partir da digestão em KOH 30% a quente e precipitação do glicogênio a partir da passagem por etanol. Entre as fases de purificação e precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos, e o glicogênio foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, conforme metodologia proposta por Siu, Russeau e Taylor (1970). Os valores estão expressos em mg/100 mg de peso úmido.

Tabela 2. Porcentagem do tipo de fibra dos músculos Glúteo máximo (GM), glúteo médio (GMed) e Ilíaco (I).

% do Tipo de fibra	I	IIA	IID/X	IIB
GM	7	77	26	58
GMe	1	46	19	79
I	15	22	27	61

Delp e Duan (1996).

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E DNA

Amostras dos músculos glúteo máximo, glúteo médio e Ilíaco foram direcionadas a avaliação da concentração de proteínas totais utilizando-se o Kit PROTAL da Laborlab®, cujo os valores são expressos em mg/100mg. A seguir, foi avaliada a concentração de DNA pelo método da difenilamina onde o homogenato tecidual é submetido à presença de uma solução de difenilamina e posteriormente a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm segundo o método proposto por GILES e MYERS (1965).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA.

Alíquotas do plasma coletado nos grupos controle e imobilizados foram encaminhadas para dosagem de corticosterona através de radioimunoensaio segundo Kit comercial (Commercial kit ICN pharmaceutical, Inc., EUA) que expressa valores em µg/mL. Esta avaliação foi realizada em cooperação técnica com o Laboratório de Pâncreas da UNICAMP.

ANÁLISE BIOMOLECULAR: EXTRAÇÃO DE TECIDOS, HOMOGENEIZAÇÃO E IMMUNOBLOTTING.

Amostras dos músculos glúteo máximo, glúteo médio e íliaco foram lavados em salina e colocados em tampão de extração. O material foi submetido a homogeneização em tampão de extração (100 mM Trisma base, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF diluído em álcool etílico, 1% Triton X-100 e 0,1 mg/ml aprotinina), à 4°C, utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os fragmentos celulares foram então centrifugados (15.500 x g, 20 minutos, 4 °C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio.

Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais enquanto que a outra parte foi submetida à *immunoblotting* obedecendo a seguinte sequência, a saber: após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, e então aquecido por 5-10 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (75 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A ligação dos anticorpos à proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com tampão de bloqueio à temperatura ambiente (TA) (5% BSA dissolvido em solução basal). A membrana de nitrocelulose foi incubada, *overnight*, com anticorpos específicos diluídos em solução para anticorpo (3% BSA dissolvido em solução basal), e então, lavada por 15 minutos com solução basal (150 mM NaCl, 10 mM

Trisma base e 0.02% Tween 20). A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por quimioluminescência, utilizando-se *kit* comercial da Amersham e seguindo as orientações do fabricante. Após a revelação das auto-radiografias, as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica. Esta análise foi realizada em cooperação técnico-científica com a UNICAMP.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF- α

Amostras do plasma foram utilizadas para avaliação da concentração plasmática de TNF- α através do Kit Singleplex MultiBead Kit cuja aplicabilidade se inserir em vários tipos de amostras incluindo incluindo soro ou plasma. Esta análise foi realizada em cooperação técnico-científica com a UNICAMP.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA e teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Baseado na possibilidade do modelo de imobilização da pelve ser uma condição indutora de estresse, uma vez que, se fundamenta na inserção de um agente físico que modifica a capacidade de deambulação, foi avaliada a concentração plasmática de corticosterona, que é o principal hormônio indicador desta condição e não foi observado diferença entre os grupos controle e submetidos a imobilização pélvica, com mostra a figura 3.

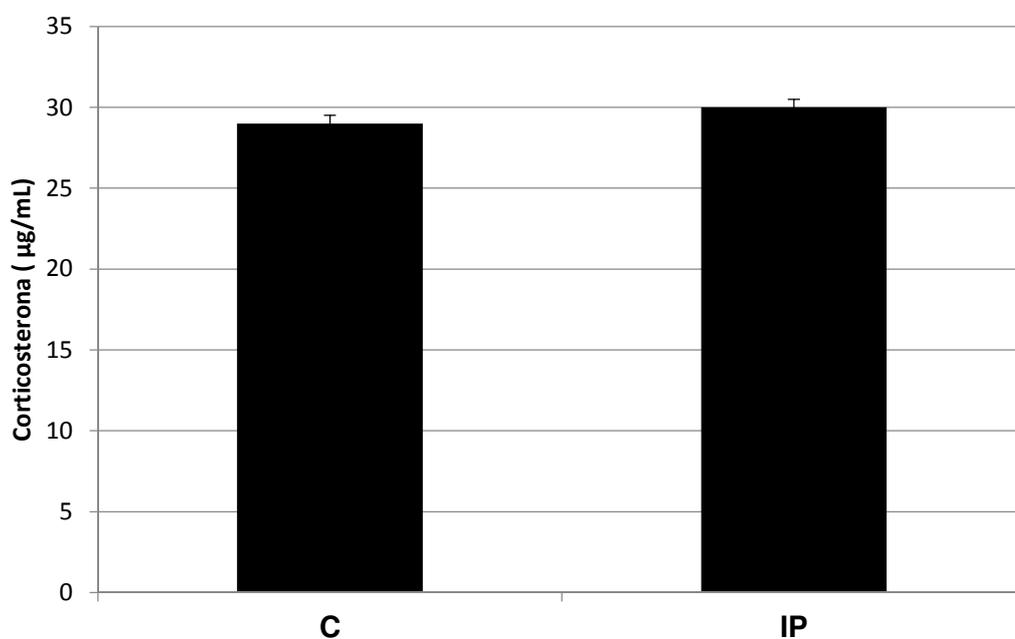


Figura 3. Concentração plasmática de corticosterona (µg/mL) dos grupos controle (C) e imobilização pélvica (IP). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5.

No mesmo perfil de análise foram avaliadas as reservas glicogênicas musculares (RG) sendo observado que o desuso gerado pela órtese promoveu redução nas reservas atingindo 79% no glúteo máximo (GM), 70,9% no glúteo médio (GMe) e 59,2% no íliaco (I) indicando comprometimento nas reservas energéticas.

Sequencialmente, os mesmos músculos foram avaliados após 7 dias da retirada da órtese (remobilização), sendo observado que as RG recuperaram parcialmente atingindo valores 89% maiores no GM e 62% no GMe e 53% no I (figura 4).

Cabe ressaltar que, mesmo após a remobilização, as RG ainda permaneceram menores se comparadas ao controle, estando assim distribuídas, 60% menor no GM, 52,6% no GMe e 44,7% no I, como mostra a figura 4.

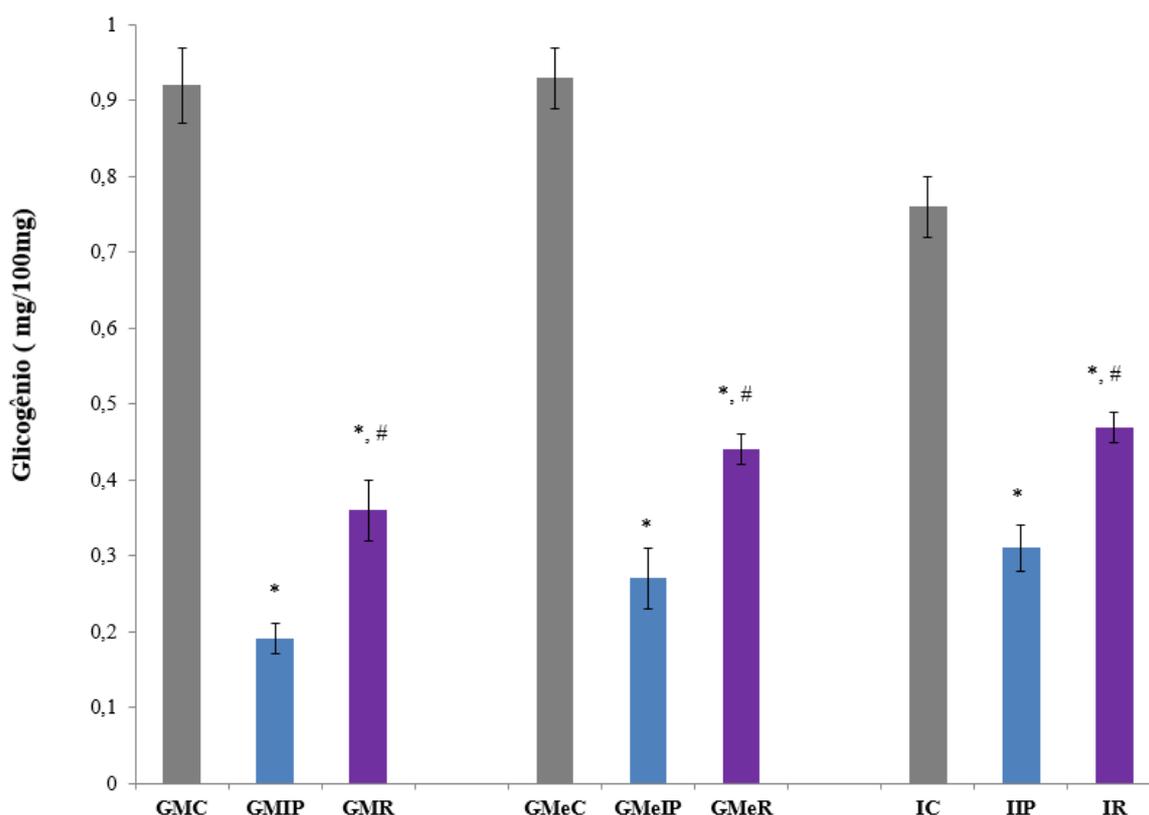


Figura 4. Concentração de glicogênio (mg/100mg) nos músculos glúteo máximo (GM), glúteo médio (GMe) e Íliaco (I) nas condições controle (C), imobilização pélvica (IP) e Remobilizado (R). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado.

Na análise da relação proteína total/DNA foi verificado que o desuso gerado pela imobilização promoveu redução de 63% no glúteo máximo (GM), 51% no glúteo médio (GMe) e 52,2% no íliaco (I) indicando perda de mionúcleos e atrofia e de forma mais intensa no músculo glúteo máximo. Por sua vez, na avaliação realizada após 7 dias da retirada da órtese, ou seja, na remobilização, foi observado recuperação parcial na relação proteína total/DNA, atingindo valores 36% maiores no GM, 63% no GMe e 45% no I (figura 5). Após a remobilização, a relação PT/DNA ainda permaneceu menor, se comparada ao controle e assim distribuídas: 50% menor no GM, 33% no GMe e 30% no I, como mostra a figura 5 .

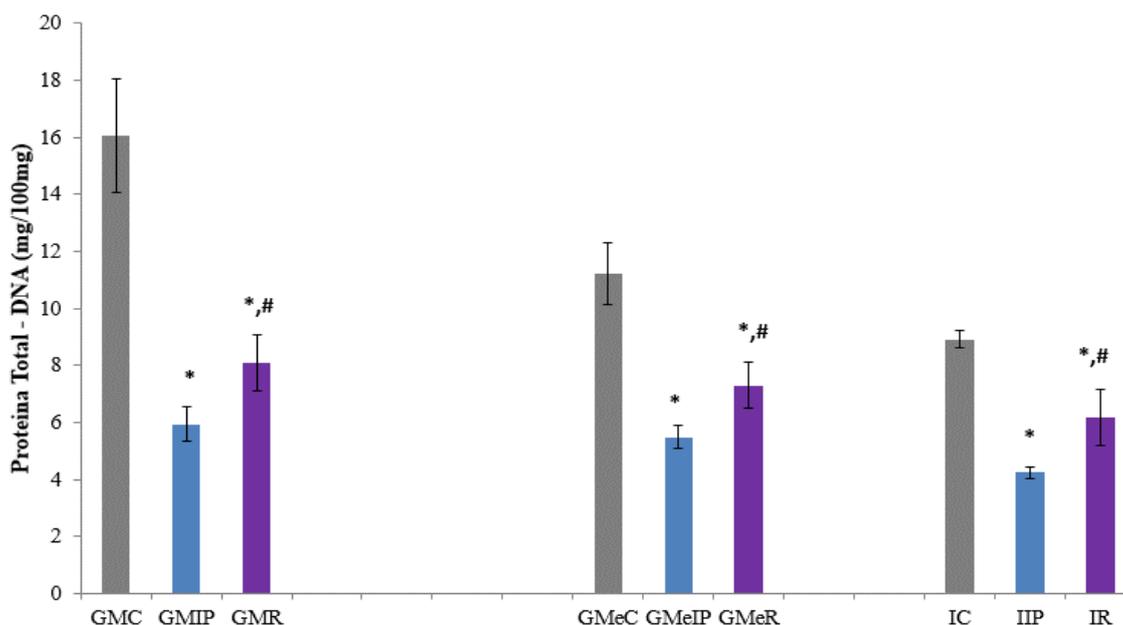


Figura 5. Relação proteína total/DNA (mg/100mg) nos músculos glúteo máximo (GM), glúteo médio (GMe) e íliaco (I) nas condições controle (C), imobilização pélvica (IP) e Remobilizado (R). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado.

Ainda dentro do aspecto metabólico, foram avaliadas as reservas glicogênicas musculares em um grupo tratado com LED e como pode ser observado na figura 6, foi observado que o grupo tratado apresentou reservas glicogênicas 37% maiores no glúteo máximo, 30% no glúteo médio e 29% no íliaco.

As alterações demonstradas na relação proteína total/DNA indicam que o músculo glúteo máximo foi o mais afetado na imobilização pélvica gerada pela órtese (Figura 5). Para reiterar este perfil, destacam-se as variações no peso úmido sendo demonstrado na figura 7 que a aplicação de LED não modificou o peso tanto na condição controle quanto na condição imobilizado pela órtese.

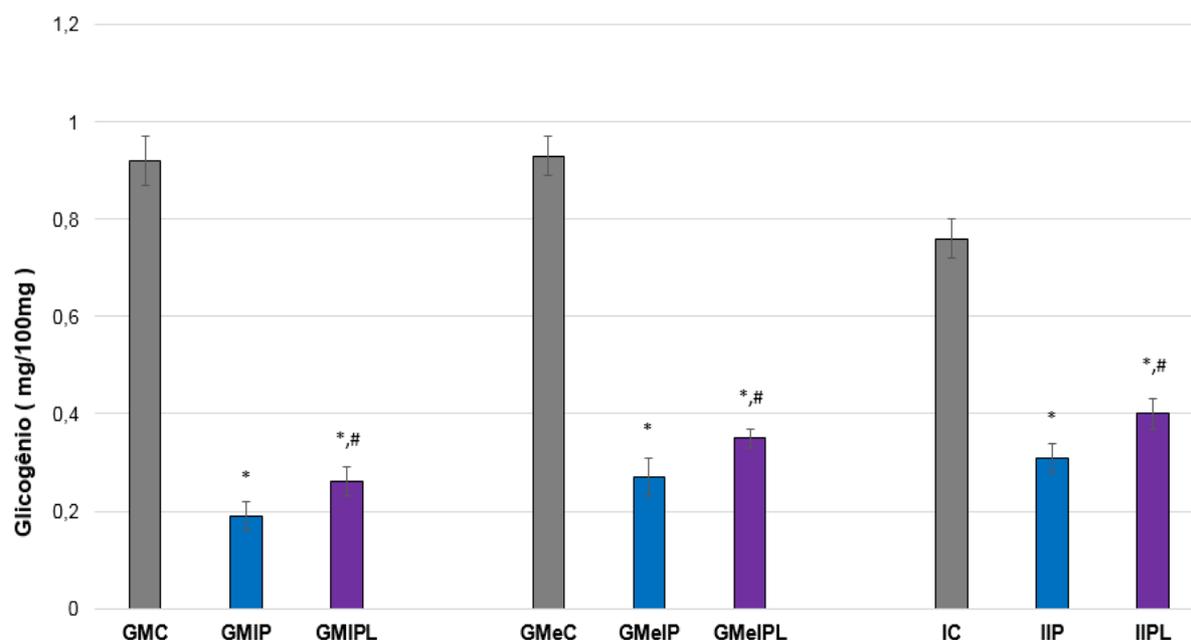


Figura 6. Concentração de glicogênio (mg/100mg) nos músculos glúteo máximo (GM), glúteo médio (GMe) e Íliaco (I) nas condições controle (C), imobilização pélvica (IP) e imobilização pélvica tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado

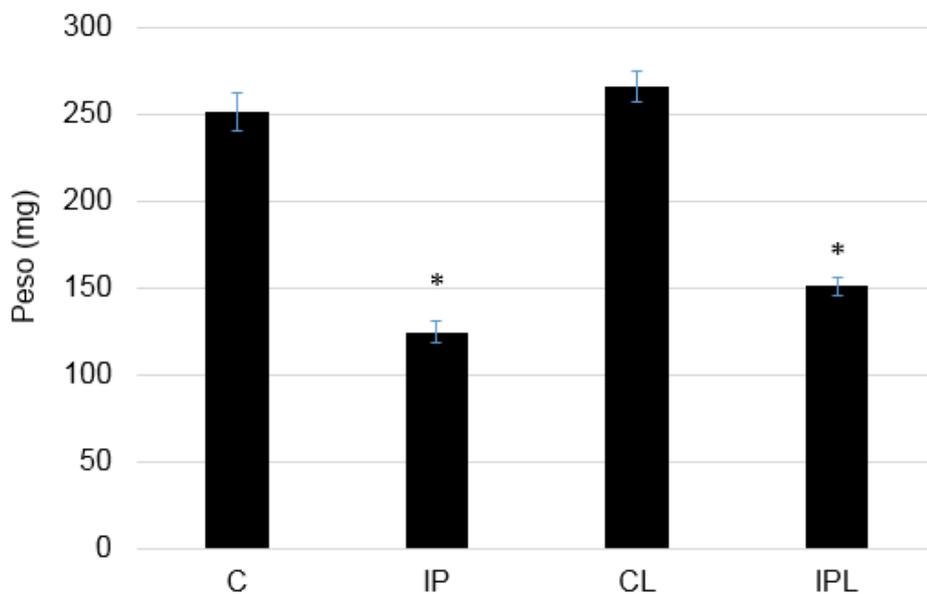


Figura 7. Peso (mg) do músculo glúteo máximo nas condições controle (C), imobilizados com a órtese (IP), controle tratado com LED (CL) e imobilizado tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle.

As observações no âmbito bioquímico, instigaram a avaliação biomolecular iniciando pela fosforilação do receptor de insulina representado na figura 8, sendo observado, que a imobilização pélvica promoveu redução na fosforilação dos receptores de insulina atingindo $34,8 \pm 7\%$ no músculo glúteo máximo; $30 \pm 4,5\%$ na fosforilação no músculo glúteo médio e $20,5 \pm 3,0\%$ no músculo ilíaco. Na mesma figura pode-se observar que a terapia com LED aplicada em músculos normais, não promoveu modificação na fosforilação do receptor de insulina, no entanto, quando a terapia foi aplicada nos músculos submetidos a imobilização pélvica foi observado que os músculos apresentaram maior fosforilação atingindo $30 \pm 6,4\%$ no músculo glúteo máximo; $15 \pm 3,2\%$ no músculo médio, não sendo verificada ação no músculo ilíaco. Mesmo havendo melhora na dinâmica de recepção do sinal insulínico no músculo imobilizado, estes não atingiram a condição observada no grupo controle ficando 18% menores no músculo glúteo máximo, 21% no glúteo médio e 32% no ilíaco (Figura 8).

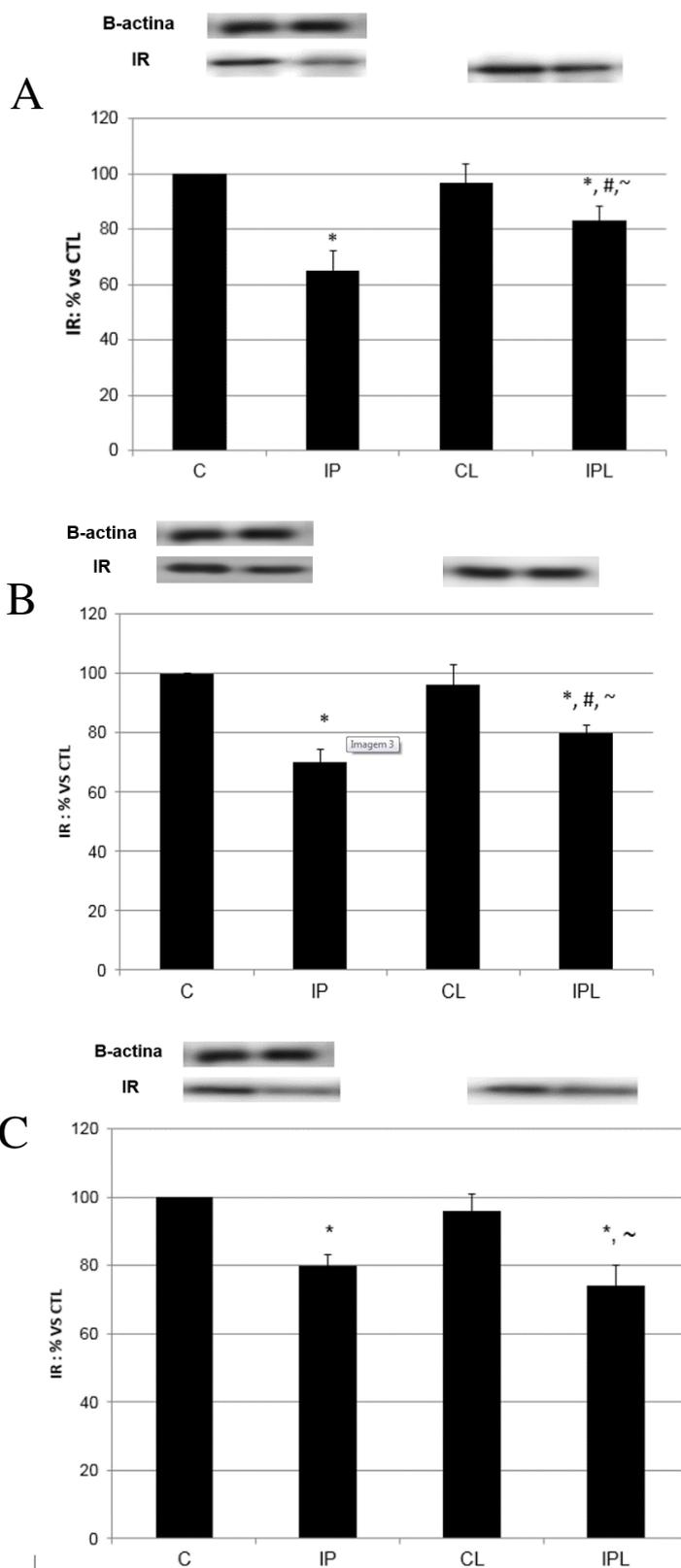


Figura 8. Porcentagem de fosforilação do receptor de insulina nos músculos glúteo máximo (A), glúteo médio (B) e íliaco (C) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP), controle tratado com LED (CL) e imobilização pélvica tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilização pélvica, ~ p<0,05 comparado ao CL.

Ainda no âmbito molecular, foi avaliado a fosforilação da enzima mTOR sendo observado que a imobilização pélvica promoveu redução de $25,6 \pm 3,5\%$ na fosforilação da mTOR do músculo glúteo máximo; $29,2 \pm 4,0\%$ no músculo glúteo médio e $22,6 \pm 4,5\%$ no músculo ilíaco. Com relação a terapia com LED aplicada em músculos normais, não foi verificado modificação na fosforilação da mTOR, no entanto, quando a terapia foi aplicada nos músculos submetidos a imobilização pélvica não foi constatado mudança na fosforilação no músculo glúteo máximo, no entanto, houve elevação de $25 \pm 9\%$ no músculo glúteo médio e $10 \pm 5\%$ no músculo ilíaco. Com relação aos músculos que manifestaram pequena melhora estes não atingiram a condição observada no grupo controle ficando 20% abaixo no glúteo médio e 17% no ilíaco (Figura 9).

No mesmo sentido foi avaliada a fosforilação da enzima AMPK sendo observado que a imobilização pélvica promoveu redução de $40 \pm 3,7\%$ na fosforilação da enzima AMPK do músculo glúteo máximo; $35 \pm 6,3\%$ no músculo glúteo médio e $18,4 \pm 5,9\%$ no músculo ilíaco. Por sua vez, a aplicação da terapia com LED aplicada em músculos normais, não promoveu modificação na fosforilação da AMPK, entretanto, quando a terapia foi aplicada nos músculos submetidos a imobilização pélvica foi constatado aumento na fosforilação atingindo $27\% \pm 3,1\%$ no músculo glúteo máximo, $26,4 \pm 8\%$ no músculo glúteo médio e $10 \pm 5,1\%$ no músculo ilíaco. Cabe ressaltar que os músculos supra-citados não apresentaram valores similares aos observados no grupo controle ficando 20% abaixo no glúteo máximo, 27% no glúteo médio e 15% no ilíaco (Figura 10).

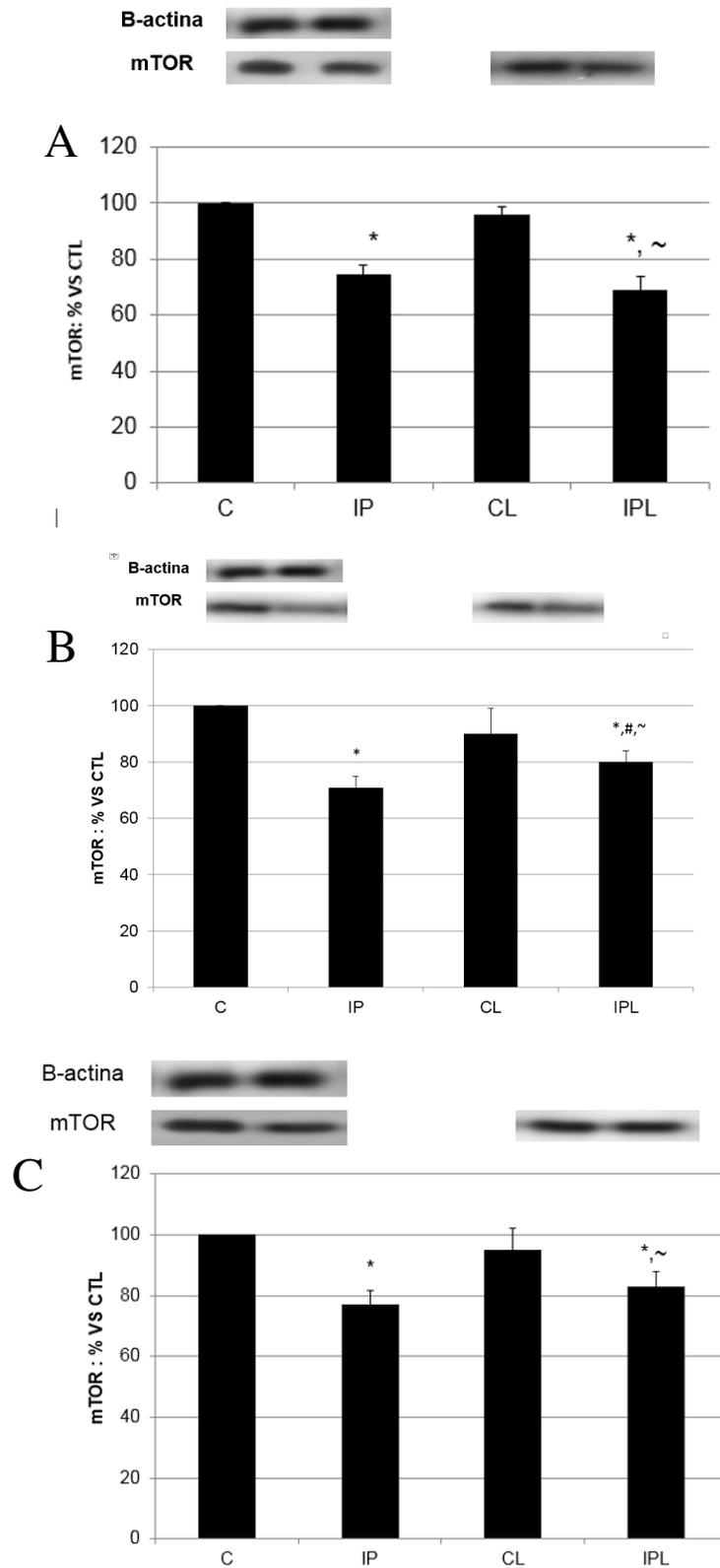


Figura 9. Porcentagem de fosforilação do receptor da enzima mTOR nos músculos glúteo máximo (A), glúteo médio (B) e Ilíaco (C) dos grupos dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP), controle tratado com LED (CL) e imobilização pélvica tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado à imobilização pélvica, ~ $p < 0,05$ comparado ao CL.

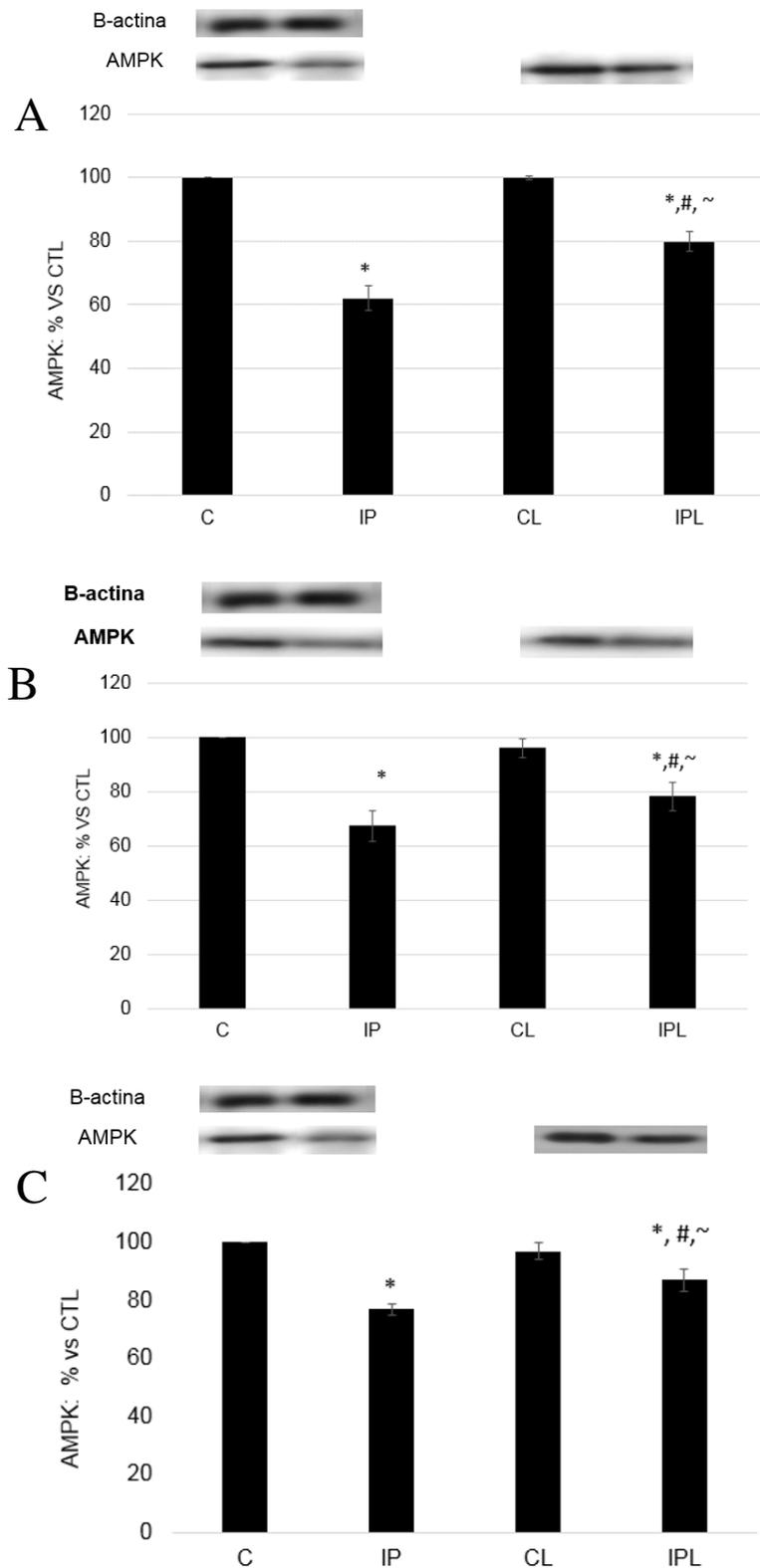


Figura 10. Porcentagem de fosforilação do receptor da enzima AMPK nos músculos glúteo máximo (A), glúteo médio (B) e Ilíaco (C) dos grupos controle (C), imobilizados (I), controle tratado com LED (CL) e imobilizado tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=5. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao imobilizado, ~ $p < 0,05$ comparado ao tratado com LED.

A seguir foi avaliada a concentração plasmática de TNF- α sendo verificado que músculos normais submetidos ao tratamento com LED não apresentaram modificação na concentração plasmática, no entanto, o grupo submetido ao desuso imposto pela órtese apresentou concentrações 18% maiores, valores que foram 13% menores no grupo imobilizado com a órtese e tratado com LED, como mostra a figura 11.

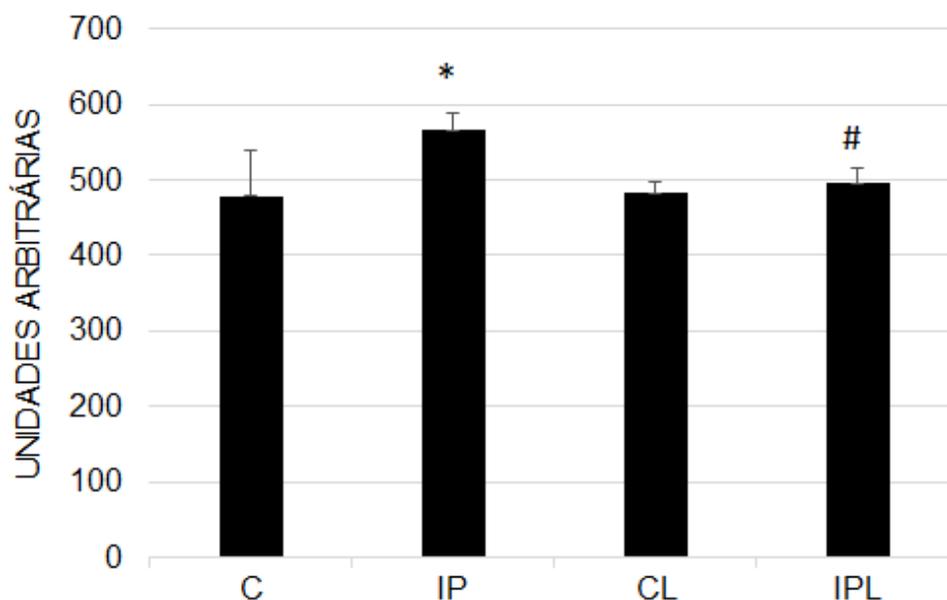


Figura 11. Concentração plasmática de TNF- α em unidades arbitrárias dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP), controle tratado com LED (CL) e imobilização pélvica tratado com LED (IPL). Os valores correspondem à média \pm dp, n=3. *p < 0,05 comparado ao controle, #p<005 comparado ao grupo imobilização pélvica.

DISCUSSÃO

Dentre os parâmetros que norteiam as atividades de pesquisa, a concentração plasmática de corticosterona merece especial consideração, por ser indicativo da intensidade de estresse que o procedimento experimental possa estar induzindo no animal experimental (Sandi et al., 1996). Ao propormos o uso de uma órtese indutora de imobilização pélvica, ressaltou a necessidade de se avaliar a concentração plasmática de corticosterona, uma vez que o estresse e a imobilização são condições que podem propiciar elevação na secreção de catecolaminas e glicocorticóides (Hirose et al., 2000). Nesta análise, não foi observado diferença entre os grupos controle e submetidos a imobilização, desta forma, as concentrações observadas acompanharam a literatura indicando que o procedimento aplicado na imobilização pélvica, não é uma condição indutora de estresse, a qual significativamente possa ter influenciado nos dados. (Yvonne et al., 2006; Andersen et al., 2004)

No âmbito metabólico, classicamente tem sido descrito que o desuso muscular, quer seja provocado pela necessidade de permanência por longos períodos acamado, aplicação de órteses ou suspensão de membros mimetizando microgravidades, são potentes indutores de resistência à insulina (Pierre et al., 2016; Supreeth et al., 2016)

Na literatura tem sido descrito que o desuso causado pela imobilização muscular promove múltiplos fatos representados pela redução na população de receptores de insulina, bem como na eficiência dos sistemas sinalizadores citosólicos ligados a via insulínica, tal como, a via AKT-PI3-K, indicando a implantação do quadro de resistência à insulina, condição que ao se tratar de tecido muscular, denomina-se “desuso simples”, uma vez que, os reais efeitos pelos quais

o desuso induz o quadro de resistência à insulina, ainda não está totalmente definido (Atherton et al., 2016).

Acompanhando a proposta, passou-se a avaliar os eventos promovidos pela imobilização sobre as reservas glicogênicas musculares, destacando que esta reserva é marcadora das condições energéticas e da *performance* estando diretamente vinculados ao músculo esquelético. Os resultados obtidos no grupo submetido à imobilização pélvica mostraram redução significativa nas reservas de glicogênio, e se baseia no fato tanto do comprometimento na população dos receptores insulínicos, quanto na eficiência da cascata sinalizadora da insulina sobre às vias citosólicas reguladoras da síntese de glicogênio, condições que predispõem a redução nas reservas glicogênicas (Hirose et al., 2000; Munetaka et al., 2000; Mortensen et al., 2014).

Um estudo recente realizado em biópsias musculares coletadas em humanos voluntários que permaneceram 7 dias imobilizados na cama, verificou ampla redução em funções fisiológicas, em especial, redução na captação de glicose, na concentração de GLUT4, na atividade da hexoquinase II, proteína quinase B, Akt1 e Akt2 e significativa redução na capacidade da insulina em ativar a enzima GSK responsável por promover a síntese de glicogênio (Bienso et al., 2012).

Este conjunto de informação reitera os resultados aqui obtidos, onde foi observado que a imobilização pélvica induziu expressiva redução nas reservas glicogênicas e ainda reforça o modelo de desuso da musculatura pélvica, enquanto sistema indutor de desuso muscular.

Ao aplicarmos a mesma análise, na fase de remobilização, ou seja, sete dias após a retirada da órtese geradora de imobilização pélvica, foi verificado recuperação parcial das reservas glicogênicas, de forma que, estas não retomaram

a valores similares ao controle. Cabe considerar que no músculo esquelético, a sinalização insulínica é multifatorial dependente da ligação da insulina ao seu receptor, ativação das IRSs, ativação da enzima fosfatidilinositol-3-quinase, (PI3-K), conduzindo à fosforilação e ativação do complexo enzimático iniciado pela enzima Akt, a qual fosforila a enzima AS160 que é responsável pelas dinâmicas de translocação do GLUT4, captação de glicose e formação de reservas energéticas musculares (Kramer et al., 2006). Assim, tem sido descrito que as vias sinalizadoras insulínicas comprometidas pela imobilização, somente iniciam seu restabelecimento após 15 dias, determinando uma “temporização” para que seja efetivada a recuperação (Lima et al., 2007, Wall et al., 2013, Bodine et al., 2013).

Possivelmente, a recuperação das reservas energéticas se deve ao fato da recuperação da sensibilidade a hormônios ou neurotransmissor, ser um processo lento (Bottinelli e Reggiani, 2000). Assim, é sugestiva a necessidade da aplicação de um protocolo fisioterapêutico, no intuito de auxiliar na recuperação funcional do músculo imobilizado.

No contexto da análise, foi avaliado a relação proteína total/DNA (PT/DNA) e foi verificado que o perfil acompanhou as alterações descritas na análise das reservas glicogênicas, de forma que a imobilização pélvica promoveu redução na relação PT/DNA indicando proteólise. A atrofia ligada ao desuso resulta do desequilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas, havendo consenso na literatura indicando que a redução na síntese de proteínas musculares ocorre precocemente já nas primeiras 6 h após a imobilização (Booth e Seider, 1979; Tucker et al., 1981). Recentemente, um estudo ligado no aspecto molecular demonstrou que concomitante a imobilização muscular há redução na concentração e atividade das vias enzimáticas que envolvem as enzimas PI3K e Akt acompanhado

de redução na fosforilação da enzima mTOR e consequente ativação do sistema de proteassoma ubiquitina, fatos associados que potencializam a degradação proteica (Biolo et al, 2004; Drummond et al., 2012; You et al., 2015; Mirzoev et al., 2015; Rudrappa et al., 2016).

Estudos realizados em humanos submetidos à imobilização do quadril verificaram redução da força (Kalyani et al., 2013) e massa muscular (Leenders et al., 2013) e estabeleceram relações entre a proteólise e a redução na fosforilação das enzimas mTOR e AS160. Importante acrescentar, que existem outras relações fisiológicas relacionadas a redução na fosforilação deste complexo enzimático, tal como, a redução na sinalização via IGF1, redução na fosforilação da enzima p70S6K, caracterizando um fenômeno que a literatura denomina de “resistência anabólica” (Biolo et al., 2004, Kawamoto et al., 2016).

Desta forma, um fenômeno merecedor de destaque é que a imobilização ao comprometer a fosforilação da mTOR indiretamente iníbe a enzima AS160 deflagrando a resistência à insulina, sendo um dos passos iniciais no desenvolvimento da atrofia. Na fase que corresponde a retirada da imobilização pélvica, houve recuperação parcial na relação PT/DNA, fato que pode estar diretamente relacionado ao efeito temporal na recuperação das vias sinalizadoras, responsáveis pelo equilíbrio entre a síntese proteica e a proteólise, considerando-se ainda, que possa haver diferença entre o grau de atrofia entre diferentes músculos, uma vez que, estes não atrofiam uniformemente quando imobilizados (Miokovic et al., 2012; , Lang et al., 2012).

Um estudo no âmbito morfológico realizado com o músculo extensor digital longo (4% de fibras tipo I; 11% de fibra tipo IIA; 29% fibras IID/X; 58% fibras IIB), demonstrou que 10 dias não foram efetivos na recuperação da proteólise após

imobilização (Polizello et al., 2011). Neste sentido, é sugestivo que possa haver a transposição desta descrição para os músculos avaliados, ou seja, glúteo máximo, glúteo médio e íliaco, os quais apresentam em média 70% de fibras do tipo II, similar a constituição das fibras do músculo EDL (Delp e Duan, 1996).

Atualmente a terapia LED tem sido foco de estudos, visto sua eficiência enquanto estimulante da microcirculação (Queiroz et al., 2008), indutor de aumento da atividade muscular (Kelencz et al., 2010), reparo tecidual de tecido tendinoso (Karu e Kolyakov, 2005), proliferação de fibroblasto (Casalechi, 2008), além de ser uma terapia com potencial, enquanto agente que melhora o metabolismo energético e estrutural podendo reduzir a fadiga (Ferraresi et al., 2012).

Considerando-se o perfil metabólico, destacamos que nos procedimentos experimentais vinculados a terapia com LED, a maior área do tecido muscular foi contemplada com a aplicação da terapia, buscando melhor distribuir a energia aplicada por toda a área e dentro de parâmetros que foram utilizados por outros cientistas, os quais constataram redução na fadiga muscular e aumento no desempenho muscular (Leal et al., 2011). Assim, no grupo submetido a imobilização pélvica e tratado com LED, foi observado reservas glicogênicas maiores se comparado aos músculos não tratados, sendo sugestivo que a melhora induzida pela terapia se refere a modificação na sensibilidade e a atividade das vias ligadas ao controle metabólico, uma vez que, as reservas glicogênicas são marcadoras de fadiga e indicam recomposição quando se aplicou a terapia (Costill et al., 2008).

Um estudo recente realizado em humanos avaliou o efeito de várias dosagens do LED sobre a fadiga muscular, enquanto realizava uma única extensão de perna até a exaustão e verificou efeito positivo da terapia na performance fato que pode

indicar melhora nas reservas e metabolização de substratos energéticos (Hemmings et al., 2016).

No que se refere a relação PT/DNA foi verificado que o grupo imobilizado que recebeu a terapia com LED, apresentou menor perda se comparado ao grupo não tratado. Neste sentido, um estudo investigou através de biópsia muscular, o efeito do LED sobre o desempenho físico de humanos submetidos a treinamento de força física, sendo verificado aumento na atividade dos genes PPARGC1-a, ligados a biogênese mitocondrial, da VEGF que é o agente ligado a angiogênese e principalmente ativação da mTOR (Ferraresi et al., 2012). Possivelmente, a menor perda de mionucleos se deve ao efeito do LED na expressão de diversos fatores citosólicos atuando como protetor da perda de massa.

Na avaliação do peso do músculo glúteo máximo foi verificado redução em decorrência da imobilização pélvica, no entanto, no grupo imobilizado tratado com a terapia com LED a perda de peso foi menor, indicando os efeitos da terapia nas vias enzimáticas citosólicas que atuam na interface síntese proteica/proteólise.

Ferraresi e col (2016) estudaram em gêmeos monozigóticos a terapia com LED combinada com um programa de treinamento de força durante 12 semanas. As avaliações se pautaram em biópsias musculares, imagens de ressonância magnética, análise de carga máxima e testes de resistência à fadiga antes e após o programa de treinamento para avaliar a expressão gênica, hipertrofia muscular e desempenho, respectivamente. Os resultados mostram que comparado com o placebo, o LED aumentou a carga máxima no exercício e reduziu a fadiga, acompanhado de diminuição na geração de marcadores de inflamação (interleucina 1 β) e atrofia muscular, foi observado também, que a enzima mTOR aumentou sua atividade na presença do LED, juntamente foi constatado hipertrofia do músculo da

coxa, reiterando que a terapia com LED possa ter contribuído ativando vias sinalizadoras citosólicas.

A avaliação biomolecular mostrou que a imobilização pélvica promoveu expressiva redução na população de receptores de insulina, redução na concentração da enzima mTOR, bem como na concentração da enzima AMPK, em todos os músculos avaliados, indicando que o desuso induzido pela imobilização promoveu, nos diferentes músculos, redução na sinalização intracelular comprometendo as vias metabólicas e o controle da síntese proteica.

No que se refere ao grupo experimental submetido a imobilização pélvica que foi tratado com LED, foi verificado aumento na fosforilação dos receptores de insulina, fato que pode ser entendido por duas hipóteses, ou seja, a terapia pode ter favorecido o restabelecimento na fosforilação dos receptores de insulina (IR) ou ainda pode ter interferido em algum sinalizador que esteja comprometendo a ação do receptor, destacando que a maior porcentagem de fosforilação do IR foi observado no músculo glúteo máximo e em menor intensidade no músculo glúteo médio, e ainda, não foi observado efeito no músculo ilíaco.

Esta ação diferenciada pode ter relação com a posição anatômica do músculo onde o glúteo máximo devido sua posição mais superficial, pode ter recebido o estímulo em maior intensidade que os demais, podendo haver uma hierarquia na resposta muscular dependendo da distância anatômica que se encontra da fonte do estímulo. Com relação a porcentagem de fosforilação da enzima mTOR não foi verificado diferença no músculo glúteo máximo, contudo foi observado ação de pequena intensidade nos músculos glúteo médio e ilíaco. Por fim, na avaliação da porcentagem de fosforilação da enzima AMPK foi observado elevação expressiva no glúteo máximo e médio e em menor intensidade no músculo ilíaco.

A literatura tem demonstrado a abrangência de ação da terapia com LED em diferentes sistemas biológicos promovendo melhora nas condições homeostáticas e intensificando o reparo tecidual, havendo também relatos de melhora em condições quimiometabólicas da musculatura esquelética (Ferraresi et al., 2016). Comparando as análises moleculares pode-se verificar que nos músculos submetidos a imobilização pélvica, a terapia com LED promoveu ação mais expressiva na responsividade a insulina e ativação das vias citosólicas ligadas a geração de energia, representado pelo aumento na fosforilação do IR e AMPK, respectivamente.

Estes dados são sugestivos para se propor que possivelmente a ação primária da terapia com LED seja reconstituir as vias metabólicas melhorando primeiramente o sistema gerador de energia como observado no aumento da fosforilação dos IR e da AMPK e possivelmente a recuperação das vias anabólicas esteja em um plano secundário, após recuperar o equilíbrio energético.

Por fim, na avaliação da concentração plasmática de TNF α (fator indutor de proteólise) foi verificado elevação frente a imobilização pélvica, assim como descrito em outras condições de desuso, sendo consenso entre pesquisadores que esta citocina está vinculada com o processo inflamatório, redução da massa e força muscular devido à sua ação catabólica (Jackman, Kandarian, 2004, Junior et al., 2015, Powers et al., 2016, Dideriksen et al., 2016).

Neste sentido, pesquisadores tem aplicado a terapia com LED dentro dos parâmetros aqui utilizados, sendo descrito efeitos positivos em atividades biológicas essenciais, tais como: na síntese de ATP, redução de edema e diminuição da produção de citocinas e mediadores inflamatórios tais como o TNF α (SERAFIM et al., 2011; CORAZZA et al., 2007, Turnes, 2015). Ainda relacionado ao TNF α , foi descrito que o aumento na formação de TNF- α podem causar resistência à insulina

no músculo esquelético por inibição da ativação das vias enzimáticas ligadas a PI-3K mediada por IRS-1 e IRS-2, conduzindo a disfunção metabólica e estrutural, assim, neste estudo ao observarmos que houve menores concentrações de TNF- α no grupo tratado com LED é sugestivo que haja recomposição das vias sinalizadoras citosólicas que estavam inibidas pela citocina.

CONCLUSÃO:

Com base no modelo de imobilização pélvica proposto no presente estudo, conclui-se que este promoveu redução nas reservas musculares de glicogênio, na relação de proteína total/DNA, na população de receptores de insulina e na concentração plasmática das enzimas AMPK e mTOR, mostrando-se efetivo em promover atrofia nos músculos pélvicos.

Como proposta terapêutica utilizada, o LED mostrou-se eficaz quando aplicado durante a imobilização, minimizando os efeitos deletérios deflagrados pelo desuso, propiciando melhores condições metabólicas com reflexo na menor perda de massa representado pela melhora na relação proteína total/DNA, indicando menor perda de massa. Além do mais, o LED foi importante para a diminuição da produção da citocinas TNF α , que é uma das principais citocinas de caráter inflamatório que inibem a sinalização insulínica na face intracelular.

Assim, a terapia com LED mostrou-se eficaz em minimizar alterações geradas na imobilização.

REFERÊNCIAS:

Aguila LF, Claffey KP, Kirwan JP. TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C₂C₁₂ muscle cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 1999; 276 (5): E849-E855.

Aires, M.M. *Fisiologia*. 4ª edição, Guanabara Koogan, 2015.

Andersen ML, Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. *Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação*. UNIFESP, 2004, 167p.

Arruda EJ, Grassi DO, Guirro RRJ, Silva CA. Perfil quimiometabólico de músculos esqueléticos de ratos submetidos a diferentes modelos de imobilização articular. In: XVI Congresso de Iniciação Científica, 2008, Piracicaba. *Anais da 6ª Mostra Acadêmica da UNIMEP*, 2008.

Atherton PJ, Paul LG, Stuart MP, Sue CB, Christopher MA, Charles HL. (2016). Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2016. doi: 10.1152/ajpendo.00257.2016. [Epub ahead of print]

Balogh Z, King KL, Mackay P, Mcdougall D, Mackenzie S, Evans JA, et al. The epidemiology of pelvic ring fractures: a population-based study. *J Trauma* 2007; 63(5):1066-72.

Barbosa AC, Martins FL, Barbosa MC, Dos Santos RT. Manipulation and selective exercises decrease pelvic anteversion and low-back pain: A pilot study. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2013, 26(1):33-36.

Bienso RS, Ringholm S, Kiilerich K, Aachmann-Andersen NJ, Krogh- Madsen R, Guerra B. et al. GLUT4 and Glycogen Synthase are key players in bedrest-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2012, 61,1090–1099.

Biolo G, Ciocchi B, Lebenstedt M, Barazzoni R, Zanetti M, Platen P, et al. Short-term bed rest impairs amino acid-induced protein anabolism in humans. *J Physiol*. 2004, 558:381-388.

Biolo, G.; Ciocchi, B.; Lebenstedt, M.; Barazzoni, R.; Zanetti, M.; Platen, P., et al. Short-term bed rest impairs amino acid-induced protein anabolism in humans. *J Physiol*. 2004, 558:381-388.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, David JG, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology*. 2001, 3: 1014 - 1019.

Bodine SC. Hibernation:these arch for treatments to prevent disuse-induced skeletal muscle atrophy. *Exp.Neurol*. 2013, 248,129–135.

Booth F. Time course of molecular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. *Journal of Applied Physiology*. 1977, 43: 656 – 661.

Booth FW, Seider MJ (1979) Early change in skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. *J Appl Physiol* 47: 974–977.

Bottlang M, Krieg, JC, Mohr M, Simpson TS, Madey SM. Emergent Management of Pelvic Ring Fractures with Use of Circumferential Compression, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2002, 84-A (Supplement 2): 43-47.

Bottlang, M. et al. Emergent Management of Pelvic Ring Fractures with Use of Circumferential Compression. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2002; 84 (2): 43-47.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Bases moleculares e fisiológicas da resistência à insulina. *Hipertensão*. 2002; 5(1):33-8.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2002; 46(4):419-25.

Casalechi HL. Efeito da terapia com LED de baixa potência sobre o processo de reparação do tendão de Aquiles em ratos. *Dissertação*. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo; 2008.

Chikwendu I, Jeevendra, M. Fiber atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization. *Critical Care Medicine*. 1999, 27: 275 -285.

Corazza, AV et al. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg*. 2007, 25 (2): 102–106.

Costill DL, Flynn MG, Kirwan JP, et al. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med Sci Sports Exerc*. 1988;20(3):249-54.

Costill DL, Flynn MG, Kirwan JP, et al. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2008;20(3):249-54.

Cristopoliski, F. Efeito transiente de exercícios de flexibilidade na articulação do quadril sobre a marcha de idosas. *Rev Bras Med Esporte [online]*. 2008, 14 (2): 139-144.

Cury AF, Coelho LP, Abrão MS. Dor pélvica crônica: limites e possibilidades do diagnóstico. *Perspectiva psicossomática. Femina*. 2004; 32(4):329-32.

Dangelo CA, Fattini, JG. *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

Delp M, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *Journal Appl. Physiol*. 1996, 80 (1): 261 -270.

Dideriksen K, Boesen AP, Kristiansen JF, Magnusson P, Schjerling P, Holm L, Kjaer M. Skeletal muscle adaptation to immobilization and subsequent retraining in elderly men: No effect of anti-inflammatory medication. *Experimental Gerontology*. 2016, 82: 8 – 18.

Disruptions with a Circumferential Sheet, *Journal of Trauma*. 2002, 52:158-161.

Drummond, M. J.; Dickinson, J. M.; Fry, C. S.; Walker, D. K.; Gundermann, D. M.; Reidy, P. T., et al. Bed rest impairs skeletal muscle amino acid transporter expression, mTORC1 signaling, and protein synthesis in response to essential amino acids in older adults. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012, 302: E1113-1122.

Feland JB, Myrer JW, Schulthies SS, Fellingham GW, Measom GW. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. *Phys Ther* 2001; 81: 1110-7.

Ferraresi C, Hamblin MR, Parizotto NA. Low-level laser (light) therapy (LLLT) on muscle tissue: Review performance, fatigue and repair benefited by the power of light. *Photon Lasers Med* 2012; 1(4): 267–286.

Ferraresi C, Panepucci R, Reiff R, Junior E, Bagnato V, Parizotto N. Molecular effects of low-level laser therapy (808 nm) on human muscle performance. *Phys Ther Sport* 2012;13(3): 1-5.

Ferraresi C, Bertucci D, Schiavinato J, Reiff R, Araújo A, Panepucci R, Matheucci E Jr, Cunha AF, Arakelian VM, Hamblin MR, Parizotto N, Bagnato V. Effects of Light-Emitting Diode Therapy on Muscle Hypertrophy, Gene Expression, Performance, Damage, and Delayed-Onset Muscle Soreness: Case-control Study with a Pair of Identical Twins. *Am J Phys Med Rehabil.* 2016, 95(10):746-57.

Fiório FB, Silveira L., Munin, E, Lima, CJ, Fernandes, KPS, Agnelli R, Ferrari M. Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy* 2011, 13 (6): 45-50.

Fitts, R. H., Trappe, S. W., Costill, D. L., Gallagher, P. M., Creer, A. C., Colloton, P. A., et al. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 2010, 588, 3567–3592.

Gänsslen A, Giannoudis P, Pape HC. Hemorrhage in pelvic fracture: who needs angiography ? *Curr Opin Crit Care* 2003; 9(6):515-23.

Giles KW, Myers. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature.*1965; 206(4979).

Hauschild O, Strohm PC, Culemann U, Pohlemann T, Suedkamp NP, Koestler W. Mortality in patients with pelvic fractures: results from the German pelvic injury register. *J Trauma* 2008; 64(2):449-55.

Hemmings TJ, Kendall K, Dobson JL. Identifying dosage effect of LEDT on muscular fatigue in quadriceps. *J Strength Cond Res.* 2016 [Epub ahead of print]

Hemmings TJ, Kendall K, Dobson JL. Identifying dosage effect of LEDT on muscular fatigue in quadriceps. *J Strength Cond Res.* 2016 J[Epub ahead of print]

Hirabara SM, Gorjão R, Vinolo MA, Rodrigues AC, Nachbar RT, Curi R, Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J. Biomed Biotechnol.* 2012; 37 : 24-37.

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JAJ. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000, 279: E1235–E1241.

Hodges PW, Richardson CA. Inefficient muscular stabilization of 30. the lumbar spine associated with low back pain. A motor control evaluation of transverses abdominis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1996;21(22):2640-50.

Howard FM. Chronic pelvic pain. *Obstet Gynecol.* 2003, 101(3):594-611.

Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell. Metab.* 2007, 5 (4): 237 – 252.

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 287: C834–C843.

Junior MP, Andrade RD, Lazarini Junior JR, Ornellas FH. Efeito agudo do exercício resistido sobre a interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa: uma revisão sistemática. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício, São Paulo.* 2015, 9 (56): 597-604.

Kalyani RR, Tra Y, Yeh HC, Egan JM, Ferrucci L, Brancati, F.L.(2013). Quadriceps strength, quadriceps power and gait speed in older, adults with diabetes mellitus: results from the national health and nutrition examination survey. *J.Am.Geriatr.Soc.* 2002, 61,769–775.

Karu TI; Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(4):355-61.

Kawamoto E, Koshinaka K , Yoshimura T, Masuda H, KawanakaK. Immobilization rapidly induces muscle insulin resistance together with the activation of MAPKs (JNK and p38) and impairment of AS160 phosphorylation. *Physiol Rep*, 2016, 4 (15), e12876 – e 12889.

Kelencz CA, Muñoz ISS, Amorim CF, Nicolau RA. Effect of low-power gallium-aluminium-arsenium noncoherent light (640 nm) on muscle activity: a clinical study. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010; 28(5):647-52.

Kerrigan DC, Xenopoulos-Oddsson A, Sullivan MJ, Lelas JJ, Riley PO. Effect of a hip flexor-stretching program on gait in elderly. *Arch Phys Med Rehab* 2003; 84: 1-6.

Lang SM, Kazi AA, Hong-Brown L, Lang CH. Delayed Recovery of Skeletal Muscle Mass following Hindlimb Immobilization in mTOR Heterozygous Mice. *PLoS One*. 2012; 7(6): e389- 391.

Lang SM, Kazi AA, Hong-Brown L, Lang CH. Delayed Recovery of Skeletal Muscle Mass following Hindlimb Immobilization in mTOR Heterozygous Mice. *PLoS One*. 2012; 7(6): e389- 391.

Leal Junior EC, de Godoi V, Mancalossi JL, Rossi RP, De Marchi T, Parente M, Grosselli D, Generosi RA, Basso M, Frigo L, Tomazoni SS, Bjordal JM, Lopes-Martins RA. Comparison between cold water immersion therapy (CWIT) and light emitting diode therapy (LEDT) in short-term skeletal muscle recovery after high-intensity exercise in athletes – preliminary results. *Lasers Med Sci*. 2011 ;26(4):493 – 501.

Lee D. A cintura pélvica – uma abordagem para o exame e tratamento da região lombar, pélvica e do quadril. 2 ed. São Paulo – SP: Manole, 2001.

Leenders M, Verdijk LB, Vander Hoeven L, Adam JJ, Van Kranenburg J, Nilwik R. et al. Patients with type 2 diabetes show a greater decline in muscle mass, muscle strength and functional capacity with aging. *J.Am.Med. Dir.Assoc.* 2013, 14,585–592.

Lieber, R.L. Estructura del músculo esquelético, función y plasticidad. Bases fisiopatológicas de la fisioterapia (2.a ed.), McGraw-Hill. Interamericana, Madrid (2004).

Lima SC, Caierão QM, Durigan JLQ, Schwarzenbeck A, Silva CA, Minamoto VB, Guirro RRJ. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. *Rev Bras Fisiote.* 2007, 11(4): 297-302.

Mandarim de Lacerda CA. Manual de Quantificação Morfológica: Morfometria, Alometria, Estereologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Cébio; 1994. 83p.

Mcmanus MM, Grill RJ. Longitudinal evaluation of mouse hind limb bone loss after spinal cord injury using novel, in vivo, methodology. *J Vis Exp.* 2011, (58). pii: 3246. doi: 10.3791/3246.

Miokovic, T., Armbrecht, G., Felsenberg, D., and Belavý, D. L. Heterogeneous atrophy occurs within individual lower limb muscles during 60 days of bed rest. *J. Appl. Physiol.* 2012, 113, 1545–1559.

Miranda R, Schor E, Girão MJBC. Avaliação postural los Mulheres com dor pélvica chronic . *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* [online]. 2009, 31 (7): 353-360.

Mirzoev TM, Tyganov SA, Lomonosova YN, Musienko PE, Shenkman BS. Signaling pathways regulating protein synthesis in rat soleus muscle during early stages of hindlimb unloading. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2015; 101(11):1299-308.

Montenegro ML, Vasconcelos EC, Candido dos Reis FJ, Nogueira AA, Poli-neto OB. Physical therapy in the management of women with chronic pelvic pain. *Int J Clin Pract.* 2008; 62(2):263-9.

Mortensen, B., M. Friedrichsen, N. R. Andersen, A. C. Alibegovic, L. Hojbjerre, M. P. Sonne, et al. Physical inactivity affects skeletal muscle insulin signaling in a birth weight-dependent manner. *J. Diabetes Complications.* 2014, 28:71–78.

Munetaka H, Masao K, Hiroki S, Shingo Y, Martyn JAJ. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000, 279: E1235–E1241.

Nogueira AA, Reis FJC, Poli neto OB. Abordagem da dor pélvica crônica em mulheres. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006; 28(12):733-40.

Pierre N, Appriou Z, Gratas-Delamarche A, Derbré F. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier, 2016, In press. Pierre N, Appriou Z, Gratas-Delamarche A, Derbré F. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier, 2016, In press.

Pierre N, Appriou Z, Gratas-Delamarche A, Derbré F. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radical Biology and Medicine.* 2016, 98: 197 – 207.

Polizello JC, Carvalho LC, Freitas FC, Padula N, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. Morphological effects of resumption of loading after immobilization of skeletal muscles in lengthened position in female rats. *Rev Bras Fisioter.* 2011, 15(1):73-9.

Powers SK, Morton AB, Ahn B, Smuder AJ. Redox control of skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 98: 208–217.

Queiroz LS, Wollmann DER, Nicolau RA, Pacheco MTT. Effect of LED irradiation on microcirculation of auricular mouse. *Revista da APCD*. 2008;62(2):138-42.

Ropelle ER, Pauli JR, Campello J, Carnevali JBC. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. *Motriz*. 2005; 11 (1): 49-55.

Rudrappa SS, Wilkinson DJ, Greenhaff PJ, Smith K, Idris I, Atherton PJ. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance—A Qualitative Review . *Frontiers in Physiology*. 2016, 7: 1-10.

Rudrappa SS, Daniel J, Wilkinson DJ, Paul L., Smith GK, Idris I, Atherton PJ. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance - A Qualitative Review *Front Physiol*. 2016; 7: 361.

Rui Curi, Joaquim Procópio. *Fisiologia Básica* - Guanabara Koogan, 2015.

Saad MJA, Hartmann LGG, Carvalho DS, Galoro CAO, Brenelli SL, Carvalho CRO. Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. *Endocrine*. 1995; 3:755-9.

Sandi C, Venero C, Guaza C. Novelty-related Rapid Locomotor Effects of Corticosterone in Rats. 1996, 8 (4): 794–800.

Schiaffino C, Mammucari, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic. *Skeletal Muscle*, 2012; 32: 1– 4.

Schmidt CO, Kohlmann T. What do we know about the 29. symptoms of back pain? Epidemiological results on prevalence, incidence, progression and risk factors. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2005;143(3):292-8.

Serafim KG. et al. Effects of 940-nm light-emitting diode (LED) on sciatic nerve regeneration in rats. *Lasers Med Sci*, 2012, 27 (1): 113-119.

Silva CA, Polacow MLO, Guirro RRJ, Durigan JLQ. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização aguda associada à estimulação elétrica. *Fisioterapia em Movimento*, 2006, 19:117-126.

Silva CA, Guirro RRJ, Arruda EJ, Delfino GB. Proposal of non-invasive experimental model to induce scoliosis in rats. *Revista Brasileira de Fisioterapia (Impresso)* 2012; 16: 254-260.

Silva JMN, Carvalho JP, Júnior MJM. Estudo morfométrico da terapia LED de baixa potência em tendinite de ratos Morphometric study of low power LED therapy tendonitis in rats. *Fisioterapia e Pesquisa*, 2011, 18 (4): 365-70.

Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* 1970; 28(2): 234-236.

Slimani L, Micol D, Amat J, Delcros G, Meunier B, Taillandier D, Polge C, Béchet D, Dardevet D, Picard B, Attaix D, Listrat A, Combaret L. The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012, 303(11):E1335-47.

Suetta C, Frandsen U, Mackey AL, Jensen L, Hvid LG, Bayeers ML. Ageing is associated with diminished muscle re-growth and myogenic precursor cell expansion early after immobility-induced atrophy in human skeletal muscle. *J. Physiol*, 2013, 591: 3789 – 3804.

Tötterman A, Madsen JE, Skaga NO, Roise O. Extraperitoneal pelvic packing: a salvage procedure to control massive traumatic pelvic hemorrhage. *J Trauma* 2007; 62(4):843-52.

Tucker KR, Seider MJ, Booth FW. Protein synthesis rates in atrophied gastrocnemius muscles after limb immobilization. *J Appl Physiol*, 1981, 51: 73–77.

Turnes BL. Efeito analgésico da terapia por díodo emissor de luz (830 e 950 nm) na dor inflamatória aguda e crônica: análise dos mecanismos de ação fotobiológicos . Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina. 2015, 299p.

Wall, B. T., Snijders, T., Senden, J. M., Ottenbros, C. L., Gijsen, A. P., Verdijk, L. B., et al. Disuse impairs the muscle protein synthetic response to protein ingestion in healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013, 98, 4872–4881.

Whelan HT. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 2001, 19: 305-314.

You, J. S.; Anderson, G. B.; Dooley, M. S.; Hornberger, T. A. The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice. *Dis Model Mech.* 2015, 8:1059-1069.

Yvonne M., Ulrich-Lai, Michelle M. Arnhold, and William C. Engeland. Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006, 290: R1128 –R1135.

Zhang R. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009, 46: 4-14.

Zierath JR, Hawley JA. Skeletal muscle fiber type: Influence on contractile and metabolic properties. *Plos Biology*. 2004; 10: 337-348.

Piracicaba, 18 de junho de 2014.

De: Comissão de Ética no Uso de Animais

Ref.: Aprovação de Projeto de Pesquisa

Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 05/2014 - ADENDO

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba **APROVOU** o ADENDO ao protocolo nº 05/2014: *“Desenvolvimento de dispositivo ortótico para estudo da imobilização pélvica em ratos”* incluindo estudos com aplicação de metodologias fisioterapêuticas ligadas a recuperação funcional após desuso, analisado por esta comissão.

Atenciosamente,



Prof. Carlos Alberto da Silva
Comissão de Ética no uso de Animais