

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO  
MOVIMENTO HUMANO

Caracterização do processo de Indução de escoliose em ratos: estudos em  
machos e fêmeas.

André Alves Lico Mascarin

2016

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANDRE ALVES LICO MASCARIN

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE  
INDUÇÃO DE ESCOLIOSE EM RATOS:  
ESTUDOS EM MACHOS E FÊMEAS

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

2016

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

M395c	Mascarin, André Alves Lico Caracterização do processo de indução de escoliose em ratos: estudos em machos e fêmeas / André Alves Lico Mascarin. – 2016. 64 f. : il. ; 30 cm  Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Dissertação (Mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciências do Movimento Humano, Piracicaba, 2016.  1. Escoliose. 2. Metabolismo. I. Mascarin, André Alves Lico. II. Título.  CDU – 616.711
-------	--

Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia



Os membros da Banca Examinadora da Defesa da Dissertação de Mestrado de ANDRÉ ALVES LICO MASCARIN, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, em Sessão Pública realizada em 24 de Fevereiro de 2016, consideraram o candidato aprovado.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva  
UNIMEP

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Tanno  
UNIMEP

Prof<sup>o</sup>. Dr. Igor Giglio Takaes  
FCM - UNICAMP

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que sofrem com escoliose e a todos os pesquisadores que irão usar essa obra como base para novas descobertas.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao final deste trabalho, percebo que sua concretização só foi possível, porque muitas pessoas estiveram ao meu lado, algumas mais próximas, outras mais distantes. Cada uma a seu jeito, auxiliando, apoiando ou incentivando. Quero expressar minha gratidão a elas:

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, uma das pessoas que mais me ajudou nessa vida, um exemplo de pessoa, excelente profissional e acima de tudo um grande amigo. Desde a iniciação científica insistindo e acreditando no meu potencial, motivo pelo qual eu continuei firme mesmo em momentos de fraqueza ou dúvida. Encantando com seu conhecimento e extrema humildade. Fica aqui meu agradecimento eterno por assoprar constantemente as brasas que alimentam o fogo da minha vontade de crescer, tanto profissional quanto pessoalmente. Obrigado por todos os ensinamentos durante esses anos juntos, meu respeito e admiração por você são imensuráveis, se cheguei até aqui, pode ter certeza que a culpa é sua. Obrigado de coração meu grande amigo Carlos!

Agradeço imensamente ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP), oferecido pela Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Tenho que expressar minha admiração e gratidão a todos os professores que tive no mestrado. Mais do que conhecimento científico, me mostraram que o mais básico de um bom pesquisador, é a paciência e humildade.

Aos colegas de mestrado, meu muito obrigado pelas experiências compartilhadas!

Meus amigos de profissão e da vida: Rafaela Ferreira, Eder Arruda, Luciano Chingui e Jefferson Kitamura, pelo companheirismo, pela disposição em ajudar no que fosse possível e também pelo incentivo em continuar e mergulhar no mundo acadêmico. Obrigado irmãos!

Minha gratidão se deve também a todos os funcionários da UNIMEP. Em especial a Professora e amiga Patrícia Paulino, pela disposição em me auxiliar no que fosse preciso, muito obrigado Paty!

À minha família, por todo amor, união, sustentação, compreensão e solidariedade.

Em especial à minha mãe, Guida, pela certeza de sempre poder contar com sua ajuda e apoio.

A todos que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

*Muito obrigado!*

*“Existem três classes de pessoas que são infelizes: a que não sabe e não pergunta, a que sabe e não ensina e a que ensina e não faz”*

Siddhartha Gautama

## RESUMO

Escoliose é uma complexa deformidade da coluna vertebral, apresenta caráter tridimensional e ocorre em qualquer idade, entretanto, a literatura aponta que a escoliose é mais predominante no gênero feminino, onde pode causar alterações posturais com reflexo no equilíbrio homeostático de diferentes sistemas e até comprometimento comportamental. O objetivo do presente estudo foi induzir escoliose em ratos machos e fêmeas por meio de metodologia não invasiva, a fim de se conhecer as alterações angulares da coluna, o comportamento exploratório ou ansiogênico, o perfil metabólico e biomolecular que acompanham o quadro escoliótico. Os animais foram distribuídos em grupos (n=10), a saber: controle machos (CM), escoliose machos (EM), controle fêmeas (CF) e escoliose fêmeas (EF). Os animais escolióticos receberam o dispositivo indutor, que foi trocado semanalmente até o fim do período de indução. Foi induzida a flexão para o lado direito, formando a curvatura, que foi avaliada em exames radiológicos, a exploração e o perfil ansiogênico foram avaliados no campo aberto e labirinto em cruz elevado e a concentração de peptídeo hipotalâmico (NPY) também foi avaliado. O conteúdo de glicogênio muscular foi avaliado pelo método do fenol sulfúrico e na avaliação biomolecular foram avaliadas as populações do Receptor de Insulina (IR), GLUT4 e mTOR. Os dados foram submetidos a tratamento estatístico, através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, ANOVA e teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Os resultados mostraram que o peso corporal do EM e EF foi 18% e 12% menores quando comparados aos seus respectivos controles, o grupo EF apresentou valores 20% menores se comparado a EM. Em relação a angulação da escoliose o grupo EM apresentou valor de 54° e EF de 45°. Na avaliação metabólica, o grupo EM e EF apresentaram alterações significativas nas reservas glicogênicas com maior intensidade na convexidade quando comparados aos seus respectivos controles, onde o grupo EF apresentou alterações mais severas. Houve diferença no índice de ingesta quando comparados os grupos EM e EF aos seus respectivos controles, entretanto, o mesmo não ocorreu na concentração de peptídeo hipotalâmico. Tanto o perfil da fosforilação de IR, GLUT4 e mTOR, quanto a concentração de proteínas totais seguiu distinto ao padrão descrito nas reservas glicogênicas. Conclui-se que a escoliose, tanto em machos quanto em fêmeas é acompanhada de comprometimento na homeostasia metabólica e funcional da musculatura devido a alterações no perfil enzimático e molecular desencadeados concomitante ao processo de indução da curvatura, principalmente no lado côncavo. Cabe ressaltar que as fêmeas foram mais susceptíveis as alterações que acompanham a deformidade da coluna.

**Palavras-Chave:** escoliose, ratos, ratas, metabolismo.

## ABSTRACT

Scoliosis is a complex deformity of the spine, it presents three-dimensional character and occurs at any age, however, the literature suggests that scoliosis is more prevalent in females, which can cause postural changes with reflection in the homeostatic balance of different systems and until behavioral impairment. The objective of this study was to induce scoliosis in male and female rats by a noninvasive methodology, in order to know the spine angle alterations, the exploratory or anxiogenic behavior, as well as the biomolecular and metabolic profile inherent scolioses. The animals were divided into groups (n=10), namely: male control (MC), male scoliosis (MS), females control (FC) and females scoliosis (FS). The scoliotic animals worn the inductor device, which was changed weekly until the end of the induction period. Flexion were performed to the right side, forming the curvature, which was evaluated in radiological studies. Exploratory and anxiogenic behavior were evaluated in the open field and elevated plus maze. The hypothalamic peptide (NPY) was also evaluated. Muscle glycogen was assessed by the sulfuric phenol method. Insulin Receptor (IR), GLUT4 and mTOR were also evaluated By biomolecular technics. The data passed through statistical analysis, with Kolmogorov-Smirnov test, ANOVA and Tukey test,  $p < 0,05$ . The results showed that the body weight of the MS and FS was 18% and 12% lower compared to their respective control. EF group showed values 20% lower than MS. Regarding the angle of scoliosis the MS group showed a value of  $54^\circ$  and FS  $45^\circ$ . In the metabolic evaluation, MS and FS group showed significant changes in glycogen reserves with greater intensity in the convexity side when compared to their respective controls, where the FS were committed more severely. There were significative differences in ingestion rate when comparing MS and FS to their respective controls groups, however, it did not occur in the concentration of hypothalamic peptide. Both profile of IR phosphorylation, GLUT4 and mTOR, regarding to the concentration of total protein followed different from the profile on glycogen reserves. Was conclude that scoliosis in both, males and females, is accompanied by impairment in metabolic homeostasis and in the muscles function due to changes in enzyme and molecular profiles, consequence of curvature induction process. It notes that the females were more susceptible to changes that accompany the column deformity.

**Keywords:** scoliosis, male rats, female rats, metabolism.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Parecer do Comitê de Ética	16
3.2 Desenvolvimento	16
3.3 Grupos Experimentais	16
3.4 Modelo Indutor de Escoliose	17
3.5 Aplicação do Dispositivo	18
3.6 Instalação da Curvatura	19
3.7 Determinação do peso corporal e do dispositivo	20
3.8 Controle de Ingesta	20
3.9 Análise Radiográfica	20
3.10 Mensuração da curvatura escoliótica	21
3.11 Comportamento exploratório e determinação da ansiedade	22
3.12 Eutanásia	23
3.13 Glicogênio Muscular	24
3.14 Concentração de Proteínas Totais	24
3.15 Determinação da concentração do peptídeo hipotalâmico NPY	24
3.16 Análise Biomolecular	25
3.16.1 Anticorpos e Reagentes	25
3.16.2 Extração de tecidos	25
3.16.3 Homogeneização e Determinação do conteúdo de proteínas totais (Western Blot)	25
3.16.4 Immunoblotting	26
3.17 Análises estatísticas	26
4. RESULTADOS	27

4.1	Peso corporal	27
4.2	Peso do dispositivo	28
4.3	Controle de ingesta alimentar	29
4.4	Peptídeo Hipotalâmico	30
4.5	Avaliação da exploração e ansiedade	31
4.6	Exames radiológicos	32
4.7	Glicogênio Muscular	33
4.8	Concentração de Proteínas Totais	35
4.9	Avaliações Biomoleculares	36
4.9.1	Receptor de insulina	36
4.9.2	GLUT 4	39
4.9.3	mTOR	41
5.	DISCUSSÃO	43
6.	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

## 1. INTRODUÇÃO

Escoliose é uma complexa deformidade da coluna vertebral, que apresenta alterações em caráter tridimensional, com desvios no plano frontal, sagital e transversal. Essas alterações no esqueleto axial são potencialmente progressivas quando não tratadas, prejudicando de maneira degenerativa a biomecânica, o que leva a dor, perda de mobilidade, deficiência cardíaca e até disfunção respiratória, dependendo do tempo de aparecimento da deformidade (Koumbourlis, 2006; Bettany-Saltikov et al., 2015).

Na maior parte dos casos é diagnosticada clinicamente através do “teste de Adams”, onde o componente rotacional é caracterizado pela presença de uma proeminência posterior no lado convexo da curvatura (gibosidade), essa proeminência é formada pela rotação das vértebras e do gradil costal e seu volume pode ser associado com a magnitude da deformidade espinhal (Ferreira et al., 2010).

Associado a avaliação clínica, são realizados exames radiológicos para que se possa quantificar a gravidade da escoliose por meio do método de Cobb ou Ferguson. No método de Cobb, identifica-se a vértebra superior e inferior da curvatura, uma linha é traçada paralela à borda superior da vértebra superior e outra linha paralela à borda inferior da vértebra inferior, a mensuração é feita através do ângulo formado pela intersecção dessas linhas (Dickson e Leatherman, 1988).

O método de Ferguson, consiste em traçar duas retas unindo o centro das duas vértebras limite superior e inferior com o centro da vértebra apical, mede-se o ângulo formado pela sua intersecção (Tribastone, 2001).

Considera-se escoliose o desvio lateral da coluna com 10° ou mais. Sendo classificadas como escoliose leve as curvaturas com menos de 20°, curvas entre 20° e 45° moderadas, e grave 45° ou mais (Komeili et al., 2015).

Caso a escoliose ultrapasse o limiar crítico, geralmente considerado como 30°, na fase final do crescimento, o risco de problemas de saúde na idade adulta aumenta significativamente, podendo estar incluídas alterações como diminuição na qualidade de vida, dor, deformidade estética, limitações funcionais, problemas cardiopulmonares (Weinstein; Dolan e Spratt, 2003).

Geralmente as alterações proporcionadas pela escoliose envolvem a região torácica e lombar, podendo apresentar-se em "S", tipicamente em destros com uma curvatura para direita na região torácica e esquerda na lombar, ou uma leve curvatura em "C" para esquerda na região toracolombar. Podendo haver assimetria nos quadris, pelve e membros inferiores (Kisner e Colby, 2005).

A escoliose pode ocorrer em qualquer idade, porém tende a ser clinicamente evidente durante os chamados "picos de crescimento", esses períodos de aceleração do crescimento são classicamente considerados como os dois primeiros anos de vida e a fase de adolescência (Gorman; Julien e Moreau, 2012).

A prevalência desse tipo de escoliose no Brasil varia de 2 a 4%. Na população mundial varia significativamente entre 1 e 13%, baseada em estudos de triagem em escolas que avaliam por meio da observação simples da coluna vertebral. Quando a escoliose é definida em função da medição real da curva, a prevalência é de menos de 3% para as curvas de mais de 10° e menos do que 0,3% para as curvas de mais de 30° (Koumbourlis, 2006; Souza et al., 2013).

A incidência de curvas de menor magnitude no gênero feminino, é cerca de 2:1, porém, em curvas maiores há uma maior predominância do gênero feminino,

aumentando para 10:1 ao longo de ângulos de 30 ° (Durmala et al., 2015).

A frequência de curvas direita e esquerda é idêntica. Com relação a localização da curvatura, está descrita uma frequência de cerca de 33% nas curvaturas torácicas superiores, 31% nas curvaturas torácicas inferiores, 20% nas toraco-lombares, 11% nas lombares e 5% nas lombo-sacrais (Rito, Marques e Filipe, 2012).

Apesar de a escoliose ser motivo de um grande número de pesquisas, sua causa ainda não foi totalmente elucidada. Existem diversas hipóteses na literatura, mas nenhuma confirmou a gênese desta doença. Algumas teorias acreditam que ocorre um distúrbio intrínseco na coluna (natureza genética, desenvolvimento anormal da coluna, do disco intervertebral e dos ligamentos vertebrais). Outras teorias envolvem mecanismos extrínsecos como anomalias do sistema nervoso, nos músculos paravertebrais e costelas (Kouwenhoven e Castelein, 2008).

Com relação à classificação, as escolioses podem ser divididas em estrutural que inclui fatores: idiopáticos, congênitos, neuromusculares, degenerativos e iatrogênicos; e não estrutural que inclui fatores: posturais, inflamatórios, metabólicos, traumáticos e compensatórios. Sendo que a não estrutural tem como principal característica a ausência do componente rotatório, apresentando correção mediante flexão lateral do tronco (Koumbourlis, 2006; Bonorino, Borin e Silva, 2007; Silva e Lenke, 2010; Evaniew et al., 2015).

A maioria dos casos de escoliose (85%) são de origem "idiopática", significando que a causa subjacente é desconhecida. A escoliose idiopática pode ser classificada em três subcategorias de acordo com idade em que tem início no indivíduo: "infantil" que ocorre no momento do nascimento até 3 anos de idade; "juvenil", que ocorre durante a infância; e "adolescente", ocorrendo na puberdade,

sendo essa, o tipo mais comum observado na população. Quase 10% desses jovens com escoliose, vão exigir alguma forma de tratamento, e até 0,1% acabará por exigir uma cirurgia (Stokes et al., 1996; Lonstein, 2006).

Normalmente as alterações não causam quaisquer problemas de saúde durante o crescimento, porém a deformidade de superfície resultante tem impacto negativo sobre os jovens, podendo originar problemas de qualidade de vida, e no pior dos casos distúrbios psicológicos (Durmala et al., 2015).

Apesar de existirem muitos estudos os mecanismos pelas quais as curvas se desenvolvem são desconhecidos. O crescimento da curva está relacionado com o tamanho da curvatura, a taxa de crescimento, a idade de início, gênero, e o tipo de curva (Hershkovic, et al.,2014).

Stokes (1997) constatou que a causa da progressão da escoliose é primariamente biomecânica. De acordo com sua tese, a curvatura lateral altera a geometria muscular e vertebral e o padrão de ativação muscular, o que causa uma assimetria na força da musculatura vertebral intrínseca e extrínseca. Seu estudo confirmou que a força mecânica influencia o crescimento e, portanto, a forma vertebral em crianças.

O padrão de tratamento não mudou significativamente nas últimas três décadas (Gorman; Julien e Moreau, 2012), consistindo essencialmente, no reconhecimento precoce, correção das posturas existentes e prevenção à evolução da mesma (Hershkovic et al.,2014).

Porém como a condição é na maioria das vezes indolor, o diagnóstico precoce é difícil, especialmente em países onde a triagem escolar da escoliose não é implementada. A mudança estética do corpo é mínima em fases iniciais, a maioria das alterações na forma ocorre predominantemente na parte de trás do tronco, o

que dificulta a visualização por parte dos pacientes, além disso, a mesma pode ser escondida pelo vestuário (Bettany-Saltikov et al., 2015)

Em grande parte dos casos considerados moderados é indicado o uso de órteses como Milwaukee, Boston e Chenué, associadas ou não a exercícios, que tem como objetivo reduzir e principalmente controlar a progressão da curva. Geralmente os pacientes precisam utilizar por períodos de 20h/dia ao longo de vários anos, o que afeta negativamente a qualidade de vida dos mesmos (Karimi e Kavyani, 2015).

No intuito de conter e/ou reverter à curvatura escoliótica, utilizam-se vários métodos e recursos dos quais se destacam: RPG (reeducação postural global), *Schroth*, *Klapp* e *Pilates*. Todos podem colaborar na redução da dor e melhora da flexibilidade, no entanto, com relação a contenção da progressão da escoliose, os mesmos tem apresentado baixa eficiência (Marques, 1996; Bettany-Saltikov, et al. 2014; Romano et al., 2015).

Atualmente tem se desenvolvido um conceito denominado SEAS (Scientific Exercises Approach to Scoliosis – Exercícios Científicos na Abordagem da Escoliose) que apresentou maior aplicabilidade e eficácia no que diz respeito a contenção da curvatura. Consistindo de uma avaliação criteriosa, a prescrição individual de um programa de exercícios, aprendizado dos exercícios com o terapeuta (2-3 vezes por semana) e posteriormente após o aprendizado, o paciente realiza os exercícios em sua casa diariamente (20 minutos), voltando somente a cada 2 ou 3 meses para reavaliação do terapeuta (Romano et al., 2015).

O tratamento cirúrgico é indicado nos casos mais graves (que ultrapassam 45° a 50°), quando os tratamentos anteriores falharam ou quando os

sintomas provocam disfunções cardíacas e/ou respiratórias. O ato cirúrgico além de ser uma experiência traumática, está associado a risco significativo, tanto a curto como a longo prazo. Assim, é instigante que intervenções não invasivas sejam mais exploradas e estudadas, uma vez que os resultados alcançados por essa modalidade podem ser satisfatórios (Aleissa et al., 2011; Bettany-Saltikov et al., 2015).

Sabe-se que muitas das avaliações de fundo metabólico ou moleculares não podem ser aplicadas em humanos devido as implicações éticas que tais procedimentos trariam e o impacto destas na sociedade. Desta forma, e para contribuir com o conhecimento científico, a opção ainda viável é a utilização de animais de experimentação.

Arruda, Silva e Guirro (2008), destacaram que a escoliose tem sido alvo de estudo por diferentes cientistas, em diferentes aspectos de análise e em diferentes modelos experimentais. No entanto, todas as metodologias de indução de escoliose existentes na literatura apresentam-se com caráter invasivo. Assim, notam-se variações apenas quanto ao grau de complexidade metodológica. Tal fato, além de dificultar a replicação de novos estudos, ainda pode comprometer investigações de ordem químiometabólica.

No que diz respeito aos métodos de desenvolvimento da escoliose experimental em animais, a literatura apresenta estudos que se basearam apenas na curvatura. Assim, dentre os estudos realizados para se obter um modelo escoliótico, é possível constatar uso de fármacos e químicos para deformar os tecidos (Nogami, Terashima e Tamaki, 1977; Tanaka et al., 1982).

No intuito de desenvolver a curvatura escoliótica, outros estudos utilizaram sutura muscular e estimulação elétrica unilateral na coluna de ratos (Sarwark et al., 1988; Joe, 1990; Kasuga, 1994). Destaca-se ainda o estudo de Stokes et al. (2002), que comprometeram o crescimento dos condrócitos, feito esse que gerou alterações mecânicas nas vértebras.

Ainda mais invasivos, são os estudos que realizam pinealectomia (retirada da glândula pineal) e também amputação dos membros anteriores para induzir a postura bípede (Machida et al., 2005; Oyama et al., 2006). O estudo de Liu et al. (2011), realizou sutura muscular e ainda amputação dos membros anteriores e da cauda.

Janssen et al. (2011) investigaram metodologias voltadas para indução de escoliose na condição experimental. Nesse sentido, galinha, coelho e rato são os animais em que a condição escoliótica é investigada mais frequentemente. No entanto, primatas, ovelhas, porcos, cabras, vacas, cães e rãs, também são usados no intuito de se estudar a escoliose. O mesmo estudo dividiu os procedimentos em pré natal e pós natal, sendo que a maioria foi realizado no período pós, de modo que o procedimento de indução mais usual tem sido a imobilização (fixação de estruturas dinâmicas) associada a outros procedimentos invasivos como, sutura de músculo e retirada de estruturas ósseas.

Com base na proposta de Sarwark et al. (1988) de desenvolver escoliose em ratos num período de 12 semanas, grupos de pesquisa buscaram desenvolver uma metodologia que se diferenciasse das demais existentes. Assim, houve a elaboração do modelo que considerou o tempo de execução, risco de perda de animais, simplicidade na elaboração, e principalmente, a inexistência de ato cirúrgico, para evitar o comprometimento das estruturas anatômicas que circundam

a coluna vertebral. Se as estruturas que margeiam a coluna são mantidas em integridade então se tornam alvos da avaliação dos danos da escoliose sobre as mesmas. Trata-se de um modelo de fácil confecção, e que em curto período de tempo (6 ou 12 semanas) permite aplicação em um grande número de animais (Silva et al., 2008, Silva et al., 2012).

Dentre os pesquisadores que se dedicam ao estudo e compreensão dos múltiplos fenômenos que acompanham a escoliose, observa-se que dentre os trabalhos acima citados, o foco sempre está direcionado a animais machos, no entanto, a literatura aponta que a escoliose é mais predominante no gênero feminino, onde pode causar alterações posturais com reflexo no equilíbrio homeostático de diferentes sistemas e até comprometimento comportamental. Frente ao posto, ressalta-se a necessidade de maior atenção e estudos no âmbito experimental envolvendo os dois sexos. Assim, a hipótese que norteia o estudo é que ratos machos e fêmeas reagem diferentemente ao processo de indução de escoliose, fato que merece atenção especial quando da escolha do modelo experimental adequado ao padrão do estudo a ser realizado.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar e comparar o processo de indução de escoliose experimental em ratos machos e fêmeas, a partir de padrões quimiometabólicos e comportamentais no período de 12 semanas de indução da curvatura.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Dentro dos objetivos específicos foram avaliados os seguintes parâmetros: a) curva de crescimento dos animais, b) peso do dispositivo indutor, c) o índice de ingesta alimentar, d) a progressão da curvatura através de radiografia, e) o ângulo da curvatura mensurado com software, f) o comportamento ansiogênico e exploratório, g) as reservas de glicogênio dos músculos: peitoral, intercostal, paravertebral, abdominal e diafragma, h) a concentração do peptídeo hipotalâmico (NPY), i) avaliação biomolecular da fosforilação do Receptor de insulina (IR), GLUT4 e mTOR nos músculos paravertebrais do lado côncavo e convexo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Parecer do Comitê de Ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Metodista de Piracicaba, sob adendo ao protocolo nº. 09/2012.

#### **3.2 Desenvolvimento**

O estudo foi dividido em duas fases: Primeiramente foi aplicado nos animais o modelo indutor de escoliose, após 6 semanas foram realizadas avaliações prévias, a fim de se acompanhar parâmetros da curvatura escoliótica sinistro convexa, haja visto que a literatura apresenta seis semanas como o tempo mínimo para que se obtenha um modelo experimental de forma invasiva. Na segunda fase, após 12 semanas de indução da curvatura foram realizadas avaliações e após a eutanásia dos animais foram coletados tecidos para análise.

#### **3.3 Grupos Experimentais**

Foram utilizados ratos e ratas da linhagem *Wistar (Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia)* adquiridos na empresa ANILAB® - Paulínia,SP. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e mantidos em gaiolas coletivas com 5 animais no Biotério de pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba. Na sequência, os animais dos grupos correspondente foram submetidos ao processo de indução de escoliose a partir do 42º dia de vida (período pós-desmame), com período de 12 semanas de experimentação. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com ração (Purina para roedores) e água “*ad libitum*”, sendo submetidos a ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro. Os cuidados experimentais seguiram recomendações do *Guide for Care Use of*

*Laboratory Animals National Research Council, (1996).* Para o desenvolvimento experimental os animais foram distribuídos em grupos conforme tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos animais em grupos experimentais.

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>N</b>
Controle Machos (CM)	15
Escoliose Machos (EM)	15
Controle Fêmeas (CF)	15
Escoliose Fêmeas (EF)	15

\*Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o procedimento experimental

### **3.4 Modelo Indutor de Escoliose**

O baixo custo, fácil manuseio e a leveza do material que não oferece carga significativa ao animal, são fatores que facilitam a utilização do policloreto de vinil (PVC). Inicialmente foram confeccionados moldes em papel, para posterior confecção das órteses em filme de PVC com espessura de 0,5 mm, tendo as circunferências perfuradas com caneta de baixa rotação acoplada a um sistema de desgaste e encapado com fita isolante da marca 3M<sup>®</sup>, no intuito de minimizar o atrito do dispositivo com o corpo do animal (figura 1 A).

A órtese consistiu em dois coletes que foram posicionadas sobre a região pélvica e escapular, baseadas na morfologia do animal (figura 1B), a parte anterior apresentava menor tamanho e circunferência, a parte posterior contou com pequenos orifícios centrais, cuja finalidade foi favorecer a drenagem de urina e evitar irritação cutânea (figura 1 A).

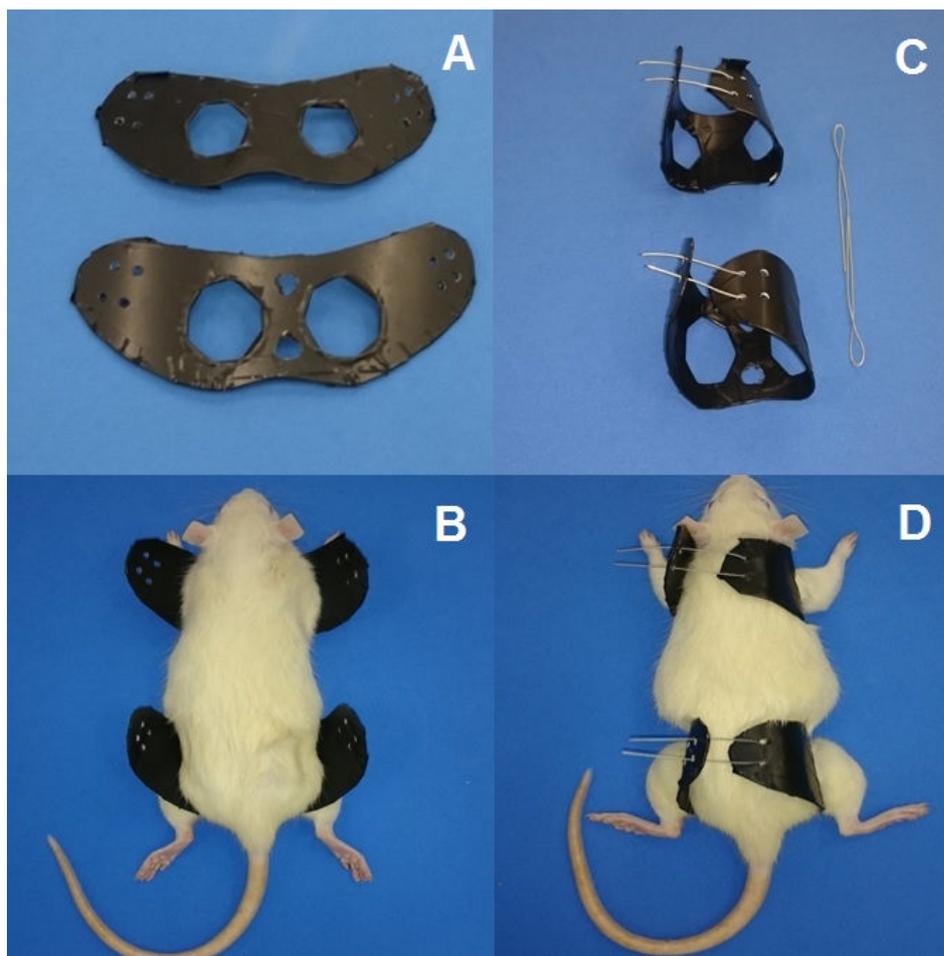


Figura 1. Dispositivo anterior e posterior (A), ajuste ao corpo do animal (B), sistema de cinta regulável (C e D).

A colocação do dispositivo foi realizada por meio de um sistema de cinta regulável, que permite melhor ajuste, de acordo com a morfologia de cada animal (figura 1 C e D).

### 3.5 Aplicação do Dispositivo

Tanto na parte anterior quanto na parte posterior do dispositivo, colocou-se um anulo de arame no lado direito, para que fosse fixado um fio metálico de 0,30 mm de espessura e 10 cm de comprimento (figura 2 A e B), no intuito de induzir a curvatura escoliótica sinistro convexa ao aproximar os coletes.

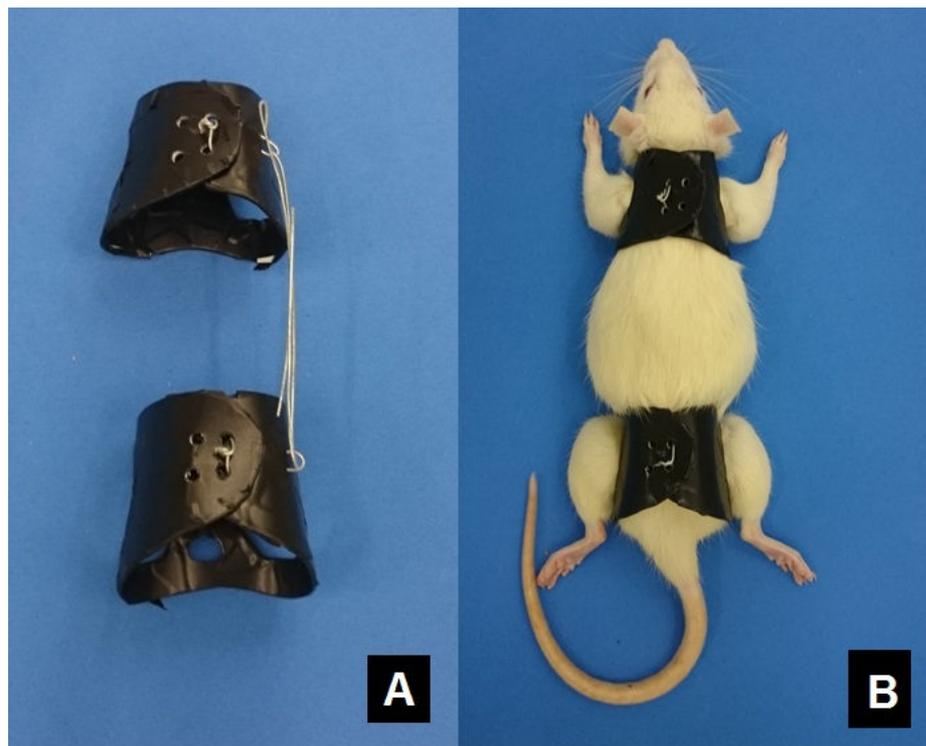


Figura 2. Parte anterior e posterior do dispositivo fechado em sistema de cinta regulável (A), com destaque para o lado direito, que conta com o anulo de arame para a passagem da haste que induz a curvatura, após o dispositivo estar ajustado ao corpo do animal (B).

### 3.6 Instalação da Curvatura

Os animais receberam o dispositivo indutor de escoliose, na fase pós desmame (42 dias), de modo que fosse aplicada uma inclinação da coluna para o lado direito de aproximadamente  $55^\circ$ , induzindo uma escoliose sinistro convexa ou em “C” à direita (figura 3: A e B). A angulação foi estabelecida com régua, de modo que cada 0,5 cm de aproximação das cinturas corresponde a aproximadamente  $20^\circ$  de inclinação. Nesse ínterim, o dispositivo foi trocado a cada 07 dias, por um novo e maior, acompanhando o crescimento do animal, sendo mantido até a 6<sup>a</sup> ou 12<sup>a</sup> semana de experimento.

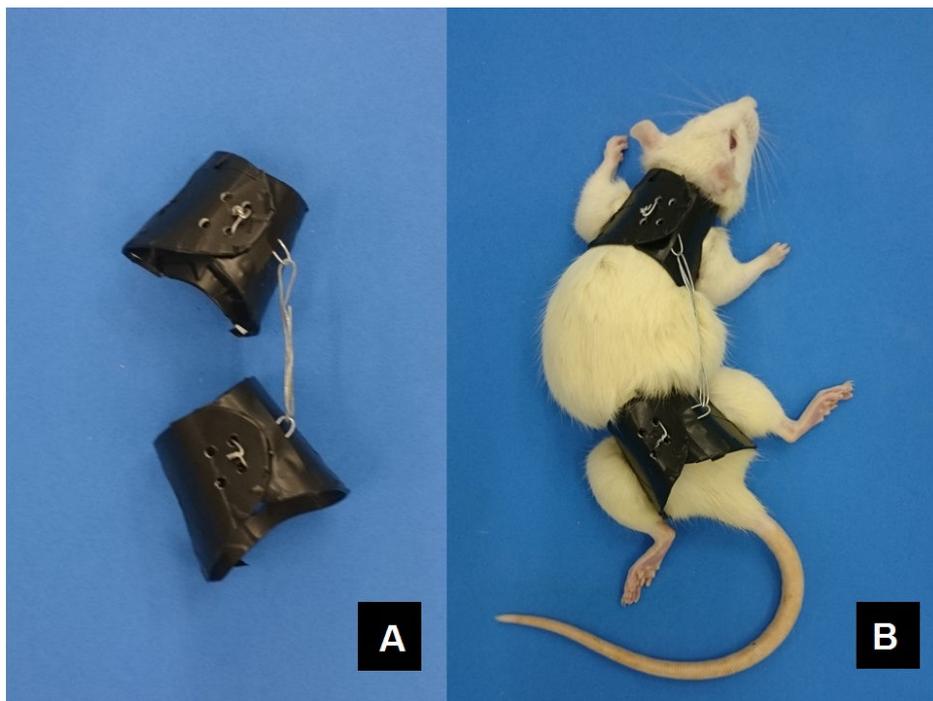


Figura 3. Dispositivo indutor pronto (A) e adaptado ao corpo do animal (B).

### 3.7 Determinação do peso corporal e do dispositivo

Os animais e os dispositivos foram pesados semanalmente, para que fosse relacionado o peso do animal com o peso do dispositivo. A pesagem foi realizada por meio de balança digital da marca FILIZOLA<sup>®</sup>. O procedimento de pesagem foi realizado sempre nos dias em que ocorria a troca (por um novo e maior) do dispositivo, sendo que os animais eram pesados sem este.

### 3.8 Controle de Ingesta

Na 6<sup>o</sup> e 12<sup>a</sup> semana de estudo, a ração foi adicionada a gaiola em horário previamente determinado e pesadas 24 horas após, por cinco dias consecutivos.

### 3.9 Análise Radiográfica

A análise radiográfica foi feita em parceria com a clínica de Radiologia da Faculdade de Odontologia da UNICAMP (FOP-PIRACICABA) sob a orientação

do Prof. Dr. Francisco Haiter Neto. Os parâmetros para realização dos exames radiográficos foram: distância foco-chassi 75 cm, intensidade 50 Kvp (quilovoltagem pico) e 6 impulsos de tempo de exposição.

Os grupos experimentais passaram por exposição radiográfica na 6ª e 12ª semana, ambos imediatamente após a retirada do dispositivo. Para a realização dos exames, foram sedados com Ketamina-Xilazina (35 mg/kg peso e 4 mg/kg peso, i.m).

### 3.10 Mensuração da curvatura escoliótica

Após a realização dos exames radiológicos em todos os grupos, as imagens foram digitalizadas e submetidas à análise no software ALCimagem 2.1® para obtenção da angulação da curvatura escoliótica. O método possui como primeira etapa a seleção do ápice da curvatura e na sequência duas retas são traçadas e ajustadas em direção as vertebra terminais nos limites inferior e superior da curvatura, e no lado côncavo é obtido a angulação escoliótica, sendo que o valor foi obtido a partir da subtração de um ângulo de 180° (figura 4).

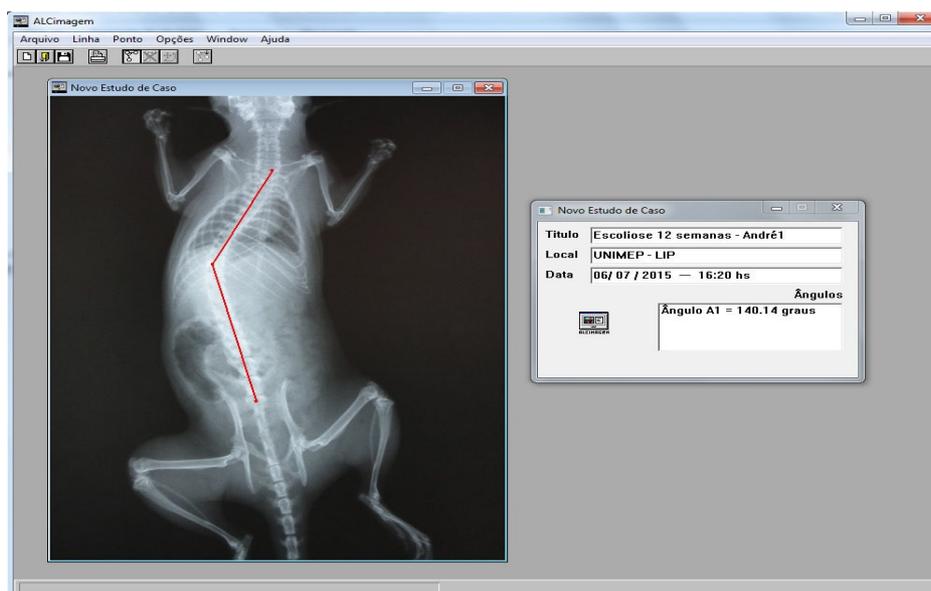


Figura 4. Obtenção dos dados referente à angulação da curvatura escoliótica.

### 3.11 Comportamento exploratório e determinação da ansiedade

Os animais foram expostos ao teste de campo aberto “open field” na 5ª e 11ª semanas, a coleta de dados foi realizada no início da noite, por ser considerado o período de maior atividade da espécie, permanecendo no ambiente durante 3 minutos, sendo filmados para melhores análises. O “open field” consiste em um quadrado com dimensão de 46x46x25cm, divididos em 9 quadrados com dimensão de 225cm<sup>2</sup> cada (figura 5 A). Foi possível avaliar o comportamento exploratório utilizando como parâmetro o índice de deambulação espontânea, onde é feito a contagem total de deslocamentos a partir do posicionamento de três membros do rato em um quadrado (figura 5 B), conforme descrito por Royce (1977).

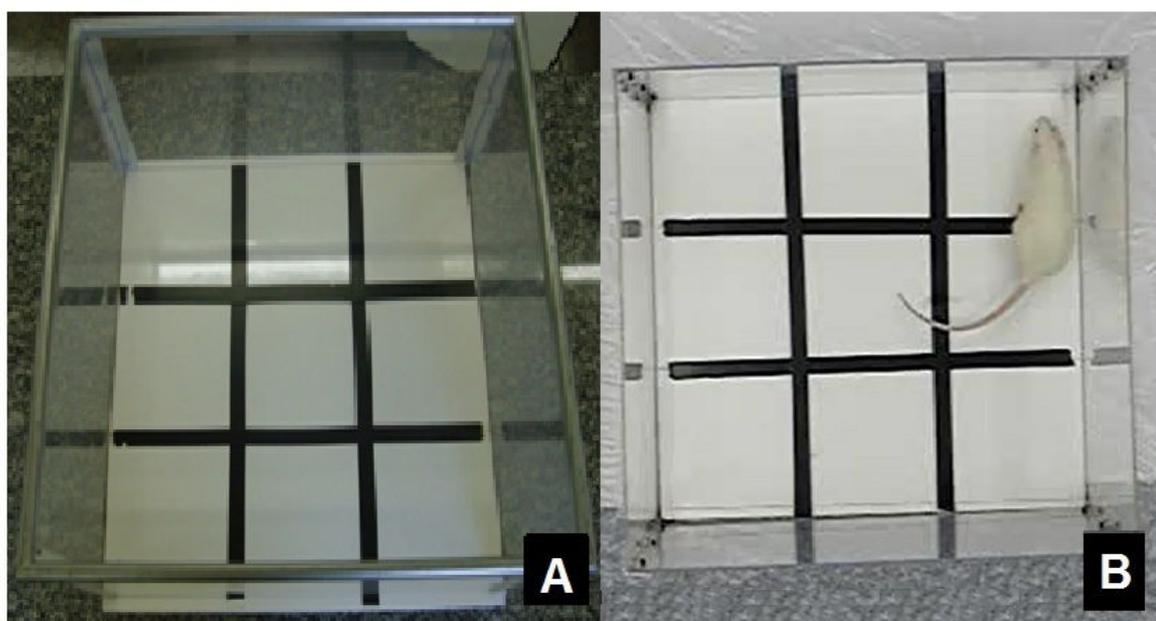


Figura 5: Campo aberto (A) e animal em teste (B).

Para avaliação do estado de ansiedade, utilizou-se o teste de labirinto em cruz elevado (LCE), que consiste em um aparato de duas superfícies horizontais de acrílico, medindo 50x10cm cada, cruzadas em ângulo reto (figura 6 A). Uma das superfícies apresenta bordas de acrílico de 1cm de altura (braços

abertos), a outra superfície é circundada por paredes de 40cm de altura (braços fechados) exceto na parte central onde os braços se cruzam (figura 6 B). Todo o aparato é posicionado a uma distância de 50 cm do solo. Dessa maneira, os animais são filmados por 5 minutos e após análise, considera-se a porcentagem de preferência (tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice fidedigno de ansiedade. Quanto maior o nível de ansiedade, menor a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (Cruz, Frei e Graeff, 1994).

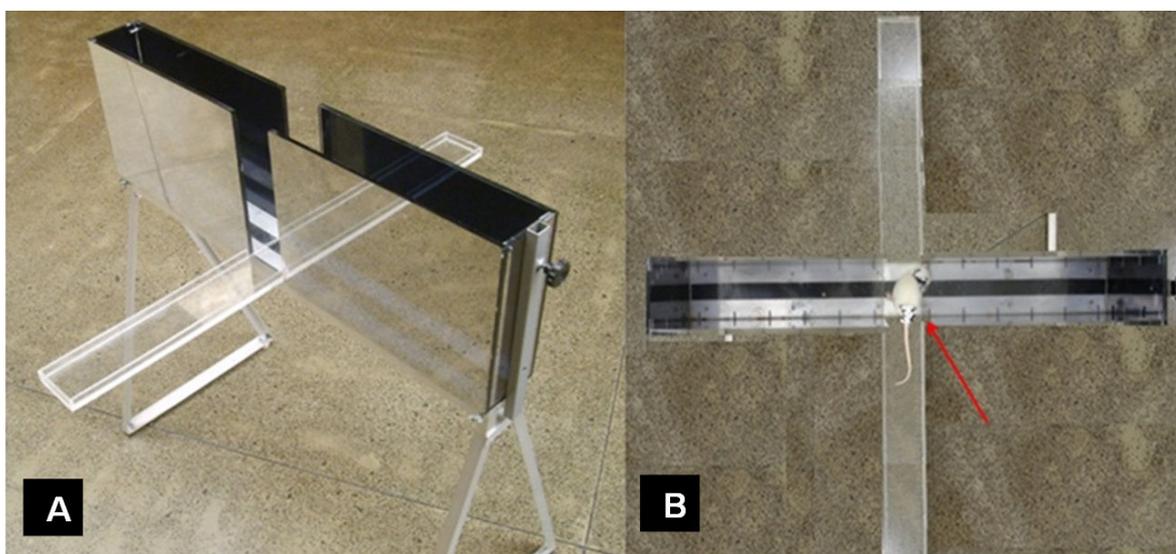


Figura 6: Labirinto em cruz elevado usado na avaliação do grau de ansiedade (A); animal em situação experimental (B).

### 3.12 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia por meio da decapitação após anestesia profunda com Ketamina-Xilazina (50 mg/kg peso e 6 mg/kg peso, i.m).

### **3.13 Glicogênio Muscular**

Amostras dos músculos peitoral, paravertebral, intercostal, abdominal e diafragma, foram coletadas após eutanásia e submetidas ao processo digestão em KOH 30% a quente e o glicogênio foi precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos e o glicogênio foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de Siu, Russeau e Taylor (1970). Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

### **3.14 Concentração de Proteínas Totais**

Após coleta dos músculos, as amostras foram processadas através do método fotolorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976), com os valores sendo expressos em mg/100mg.

### **3.15 Determinação da concentração do peptídeo hipotalâmico NPY**

Os hipotálamos dos animais foram extraídos e submetidos a homogeneização em tampão de extração, 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 através do método fotolorimétrico de Biureto, enquanto que a outra parte foi submetida à *immunoblotting* com anticorpos específicos para neuropeptídios hipotalâmicos. Esta parte do experimento foi realizado em parceria com o Laboratório de Sinalização Insulínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

### **3.16 Análise Biomolecular**

#### **3.16.1 Anticorpos e Reagentes**

Foram utilizados Anticorpos anti-IR $\beta$ , anti-phospho tirosina I $r\beta$ , anti-GLUT-4 e anti- $\beta$  actina foram obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology. Anticorpos anti-mTOR foram obtidos da empresa Cell Signaling Technology. Reagentes para determinação das proteínas totais (Biureto), SDS/PAGE e *immunoblotting* foram obtidos da Bio-Rad. Membranas de nitrocelulose foram obtidas da Amersham Corp. Kit de quimioluminescência foi adquirido da empresa Pierce Endogen (Rockford, IL). Os demais materiais utilizados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

#### **3.16.2 Extração de tecidos**

O músculo paravertebral esquerdo e direito foram rapidamente removidos, lavados em salina e colocados em tampão de extração.

#### **3.16.3 Homogeneização e Determinação do conteúdo de proteínas totais (Western Blot)**

O material extraído 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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 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 através do método fotocolorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida à *immunoblotting*.

### 3.16.4 Immunoblotting

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) 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 eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos à 120 V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, como descrito (Towbin; Staehelin e Gordon, 1979). 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 quimiluminescência, 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.

### 3.17 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA e teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Peso corporal

O peso corporal dos grupos experimentais foi avaliado da 1<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana de experimentação sendo observado que o grupo escoliose machos apresentou, em média, peso 18% menor se comparado ao grupo controle machos (figura 7).

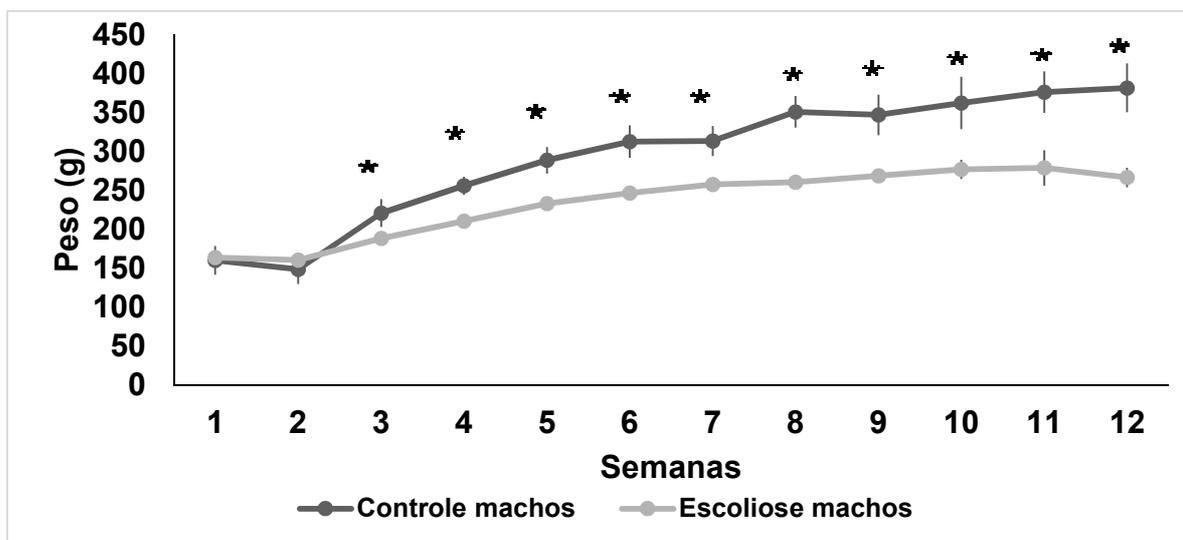


Figura 7. Massa corporal dos animais em gramas (g), referente aos grupos controle machos e escoliose machos, representados da 1<sup>a</sup> até a 12<sup>a</sup> semana. Os valores são expressos em média  $\pm$  dpm, n=10. \*p < 0,05 se comparado ao controle.

Comparando-se a evolução do ganho de peso durante as 12 semanas com foco nos grupos de fêmeas, observa-se que o grupo escoliose apresenta valores 12% menores se comparado ao controle (figura 8).

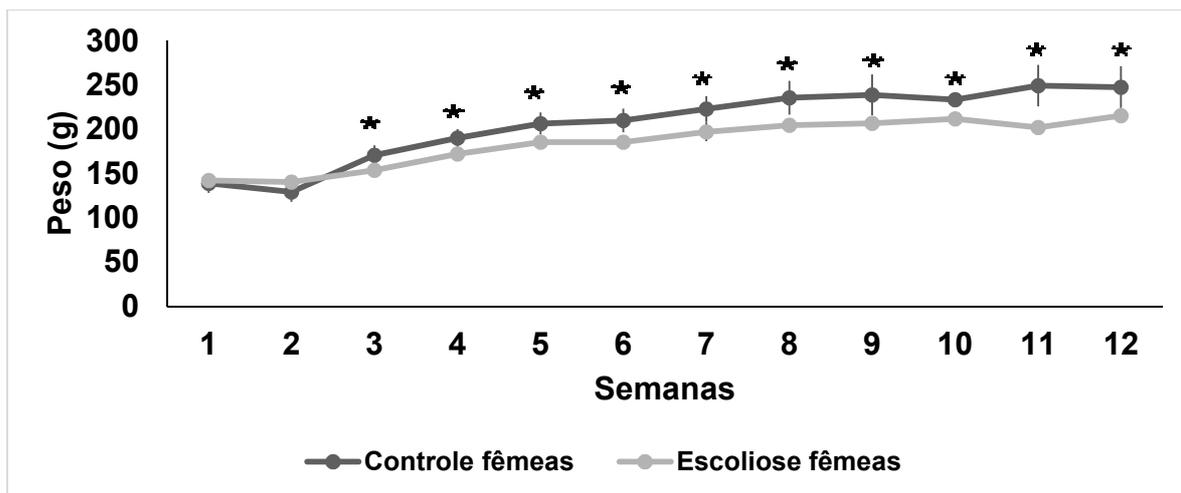


Figura 8. Massa corporal dos animais em gramas (g), referente aos grupos controle fêmeas (CF) e escoliose fêmeas (EF), representados da 1<sup>a</sup> até a 12<sup>a</sup> semana. Os valores são expressos em média  $\pm$  dpm, n=10. \*p < 0,05 se comparado ao controle.

#### 4.2 Peso do dispositivo

Durante as 12 semanas de indução de escoliose, o peso do dispositivo mostrou-se em média  $4,3\% \pm 0,2$  do peso do animal nos machos e nas fêmeas  $3,5\% \pm 0,4$ . Cabe ressaltar que, o peso do dispositivo das fêmeas mostrou-se em média  $11,5\%$  menor quando comparado ao dos machos, conforme mostra a figura 10.

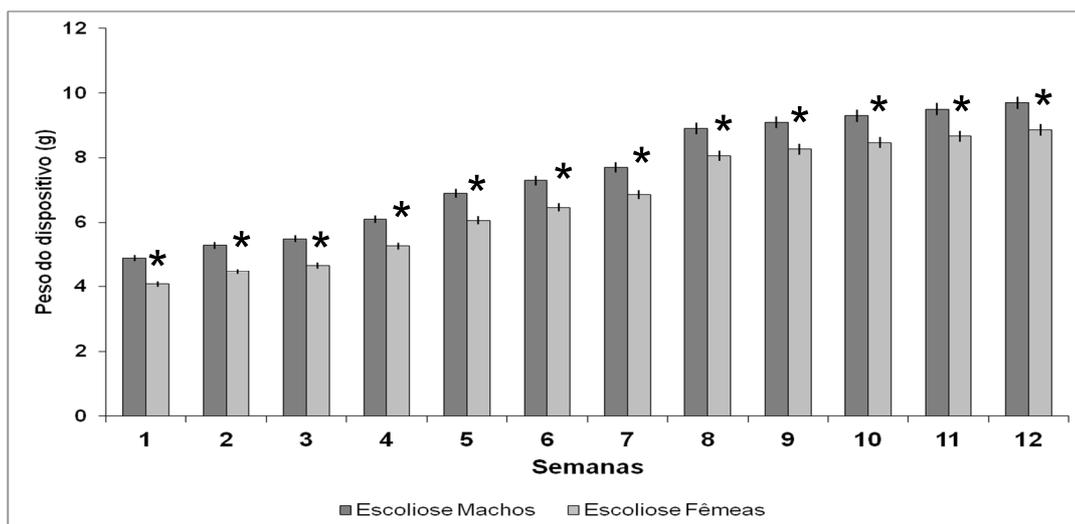


Figura 10. Peso médio em gramas (g) dos dispositivos utilizados durante a indução da curvatura escoliótica, da 1<sup>a</sup> à 12<sup>a</sup> semana nos grupos experimentais machos e fêmeas. Os valores são expressos em média  $\pm$  dpm, n=10. \*p < 0,05 se comparado ao grupo correspondente.

### 4.3 Controle de ingesta alimentar

A avaliação do índice de ingesta sólida dos grupos experimentais foi realizada na 6ª e 12ª semana. Na 6ª semana podemos observar diminuição no consumo do grupo escoliose machos (24%) quando comparado ao controle machos. O grupo escoliose fêmeas não difere do grupo controle fêmeas, porém ao se comparar com o controle machos apresenta valores 34% menores (figura 11).

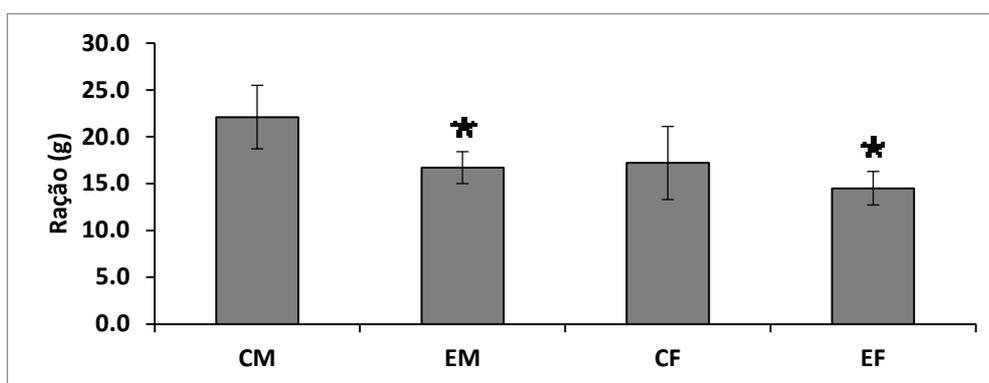


Figura 11 Média da ingesta sólida (g) por animal, dos grupos experimentais durante a 6ª semana de estudo. Os valores são expressos em média  $\pm$  dpm, n=10. Grupo controle machos (CM); escolióticos machos (EM); controle fêmeas (CF) e escolióticas fêmeas (EF). \*p < 0,05 se comparado ao controle machos (CM).

Quando a ingesta foi avaliada na 12ª semana, podemos observar que o grupo escoliose machos apresentou redução de 24% quando comparado ao controle machos, entretanto o grupo escoliose fêmeas apresentou valores 36% e 16% quando comparado aos grupos controle machos e escoliose machos respectivamente (figura 12).

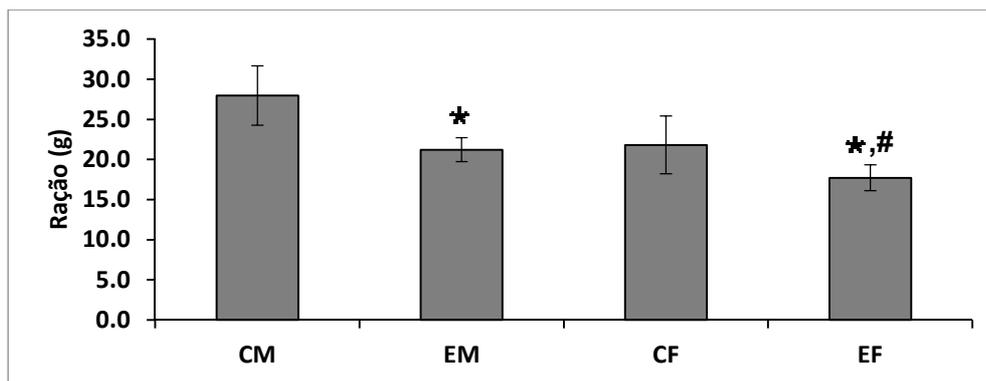


Figura 12. Média da ingestão sólida (g) por animal, dos grupos experimentais durante a 12ª semana de estudo. Os valores são expressos em média  $\pm$  dpm, n=10. Grupo controle machos (CM); escolióticos machos (EM); controle fêmeas (CF) e escolióticas fêmeas (EF). \*p < 0,05 se comparado ao controle machos (CM), #p < 0,05 se comparado ao grupo escoliose machos (EM).

#### 4.4 Peptídeo Hipotalâmico

No intuito de correlacionar uma possível alteração hipotalâmica que pudesse influenciar no peso dos animais, buscou-se avaliar o comportamento do peptídeo NPY, o qual foi quantificado em animais que foram submetidos a indução da curvatura até 12ª semana, e não foi observado diferença entre os grupos experimentais (figura 19).

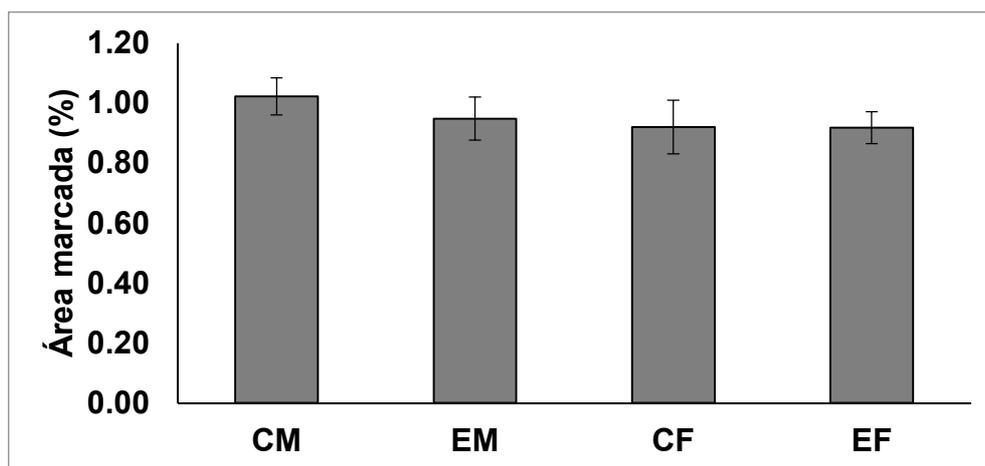


Figura 19. Quantificação da expressão gênica do peptídeo NPY em hipotálamo dos grupos controle e escoliose machos (CM e EM) e controle e escoliose fêmeas (CF e EF). Os valores estão expressos em média  $\pm$  dpm, n=5.

#### 4.5 Avaliação da exploração e ansiedade

Na 12ª semana foi realizado a avaliação da atividade exploratória no open field sendo observado que o grupo escoliose machos não diferiu do grupo controle machos (CM). Por outro lado, o grupo controle fêmeas (CF) apresentou valores maiores quando comparado ao CM e EM, 27% e 34% respectivamente. O grupo escoliose fêmeas apresentou valores 14% maiores quando comparado ao grupo EM e 23% menores quando comparado ao grupo CF (figura 13).

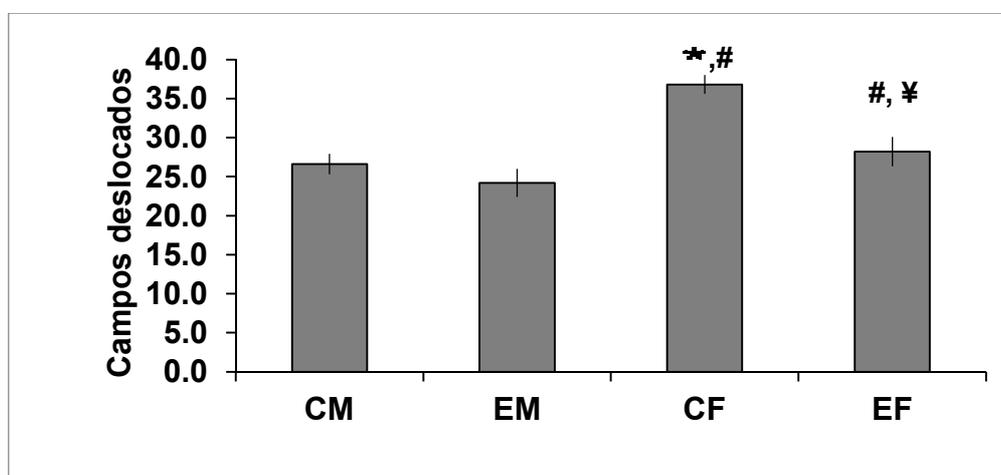


Figura 13. Número de campos deslocados na avaliação exploratória dos grupos controle e escoliose. Os valores estão expressos em média  $\pm$  dpm,  $n=5$ . Grupo controle machos (CM); escoliose machos (EM); controle fêmeas (CF) e escoliose fêmeas (EF). \* $p < 0,05$  se comparado ao grupo controle machos (CM), # $p < 0,05$  se comparado e escoliose machos (EM), ¥ $p < 0,05$  comparado ao controle fêmeas.

A seguir, os grupos experimentais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevada, sendo observado que não houve diferenças significativas entre os grupos (figura 14).

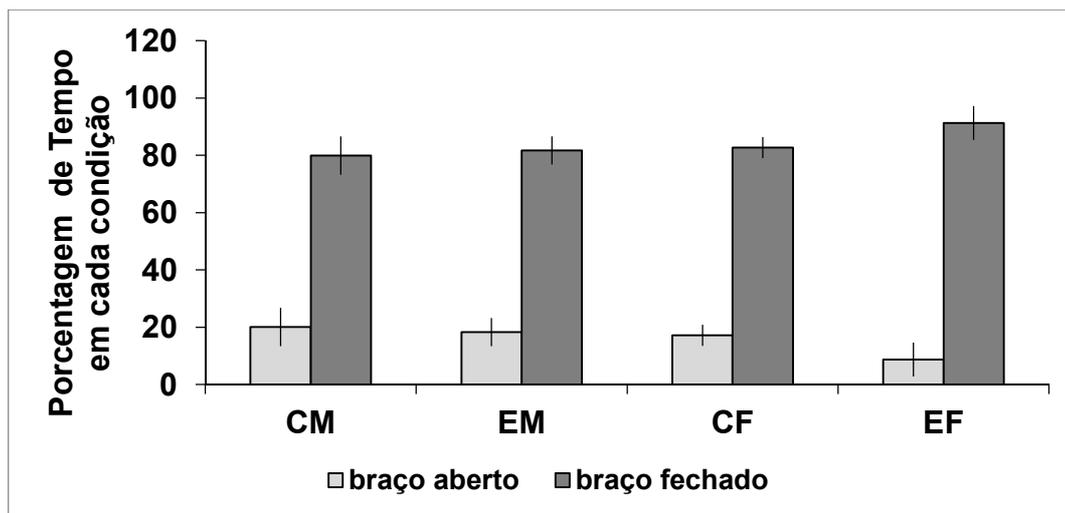


Figura 14. Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos ou fechados dos grupos experimentais: Grupo controle machos (CM); escoliose machos (EM); controle fêmeas (CF) e escoliose fêmeas (EF). Os valores estão expressos em média  $\pm$  dpm, n=5.

#### 4.6 Exames radiológicos

Na avaliação da coluna vertebral, a partir do exame de raio X, foi utilizado o software ALCimagem 2.1® que tem aplicabilidade ideal para a espécie. Na 6 semana foi realizado uma avaliação a fim de verificar a andamento da curvatura, neste sentido, a tabela 2 mostra que nos machos o modelo proporcionou escoliose com angulação 22 vezes maior se comparado a condição controle, enquanto nas fêmeas foi observado valores 5 vezes maiores.

Tabela 2: Angulação escoliótica dos grupos controle e escoliose machos (CM e EM) e controle e escoliose fêmeas (CF e EF), na 6ª semana, sendo que \* $p < 0,05$  difere do seu respectivo controle,  $n=10$ .

Grupos	CM6	EM6	CF6	EF6
Média $\pm$ dpm	2 $^{\circ}$ $\pm$ 1,9	44,4 $^{\circ}$ $\pm$ 2,1*	7 $^{\circ}$ $\pm$ 2	38,4 $^{\circ}$ $\pm$ 10,4*
Valor de p		<0,05*		<0,05*

A avaliação final foi realizada na 12ª semana, sendo observado que nos machos o modelo proporcionou escoliose com angulação 18 vezes maior se comparado a condição controle, enquanto nas fêmeas foi observado valores 6 vezes maiores (tabela 3).

Tabela 3: Angulação escoliótica dos grupos controle e escoliose machos (CM e EM) e controle e escoliose fêmeas (CF e EF), na 12ª semana, de modo que \* $p < 0,05$  difere do seu respectivo controle,  $n=10$ .

Grupos	CM12	EM12	CF12	EF12
Média $\pm$ dpm	3 $^{\circ}$ $\pm$ 1,0	54,6 $^{\circ}$ $\pm$ 1,3*	8,8 $^{\circ}$ $\pm$ 5,6	45 $^{\circ}$ $\pm$ 3,4*
Valor de p		<0,05*		<0,05*

#### 4.7 Glicogênio Muscular

A análise do conteúdo muscular de glicogênio mostrou que o grupo escoliose machos apresentou reservas de glicogênio menores representados por 21% no músculo intercostal direito, 40% no intercostal esquerdo, 26% no paravertebral esquerdo, 42% no abdominal e 29% no diafragma, quando comparados ao respectivo controle (figura 15).

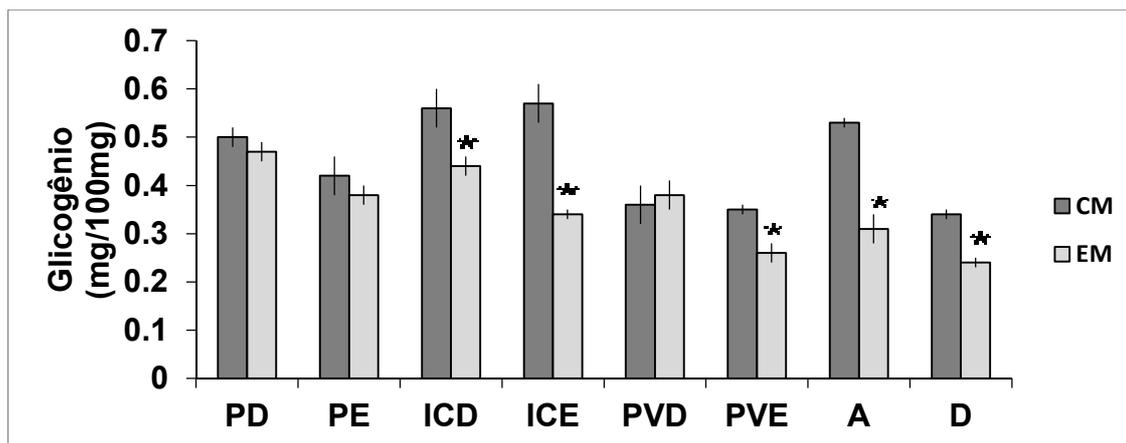


Figura 15. Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos; peitoral direito e esquerdo (PD e PE), intercostal direito e esquerdo (ICD e ICE), paravertebral direito e esquerdo (PVD e PVE), abdominal (A) e diafragma (D) dos grupos controle machos (CM) e escoliose machos (EM). Os valores correspondem à média  $\pm$  dpm, n=5. \*p<0,05 comparado ao seu respectivo controle.

O mesmo perfil de análise realizado no grupo de fêmeas mostrou que o grupo escolióticas apresentaram reservas de glicogênio menores representados por 19% no músculo paravertebral direito, 32% no paravertebral esquerdo, 19% no músculo intercostal direito, 33% no intercostal esquerdo, 32% no paravertebral esquerdo, 44% no paravertebral direito, 31% no abdominal e 32% no diafragma, quando comparada ao respectivo controle (figura 16).

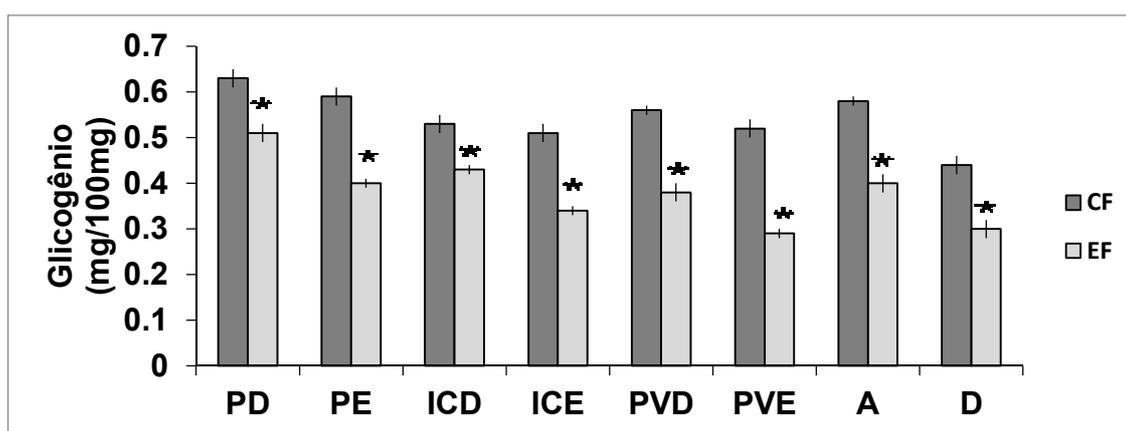


Figura 16. Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos; peitoral direito e esquerdo (PD e PE), intercostal direito e esquerdo (ICD e ICE), paravertebral direito e esquerdo (PVD e PVE), abdominal (A) e diafragma (D) dos grupos controle fêmeas (CF) e escoliose fêmeas (EF). Os valores correspondem à média  $\pm$  dpm, n=5. \*p<0,05 comparado ao seu respectivo controle.

#### 4.8 Concentração de Proteínas Totais

Na avaliação da concentração de proteínas totais nos músculos da caixa torácica e paravertebrais dos grupos macho controle e escoliose, observou-se que o grupo escoliose apresentou menores concentrações atingindo 7% no músculo peitoral direito, 21% no peitoral esquerdo, 12% no músculo intercostal direito, 17% no intercostal esquerdo, 6% no paravertebral direito, 8% no paravertebral esquerdo, 9% no abdominal e 6% no diafragma, quando comparado ao respectivo controle (figura 17).

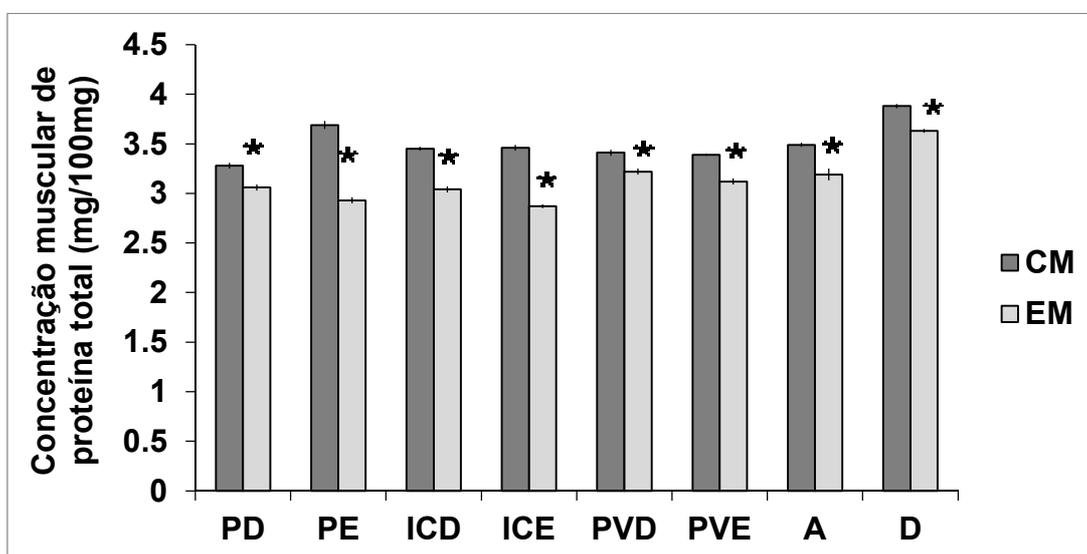


Figura 17. Concentração muscular de proteína total (mg/100mg) dos músculos; peitoral direito e esquerdo (PD e PE), intercostal direito e esquerdo (ICD e ICE), paravertebral direito e esquerdo (PVD e PVE), abdominal (A) e diafragma (D), dos grupos controle machos (CM) e escoliose machos (EM). O lado esquerdo é convexo e o direito é côncavo. Os valores correspondem à média  $\pm$  dpm, n=5. \*p<0,05 comparado ao respectivo controle.

Por sua vez, na avaliação da concentração de proteínas totais nos mesmos músculos do grupo de fêmeas controle e escoliose, observou-se que o grupo escoliótico apresentou menores concentrações atingindo 9% no músculo peitoral direito, 15% no músculo intercostal direito, 8% no intercostal esquerdo, 7% no paravertebral direito, 6% no paravertebral esquerdo, 10% no abdominal e 11% no diafragma, quando comparado ao respectivo controle (figura 18).

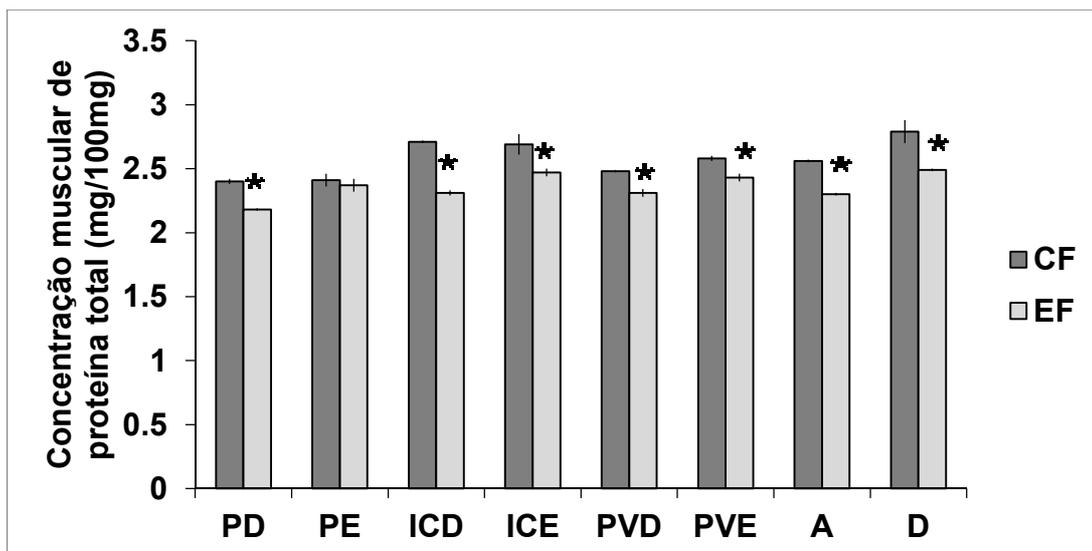


Figura 18. Concentração muscular de proteína total (mg/100mg) dos músculos; peitoral direito e esquerdo (PD e PE), intercostal direito e esquerdo (ICD e ICE), paravertebral direito e esquerdo (PVD e PVE), abdominal (A) e diafragma (D), dos grupos controle fêmeas (CF) e escoliose fêmeas (EF). O lado esquerdo é convexo e o direito é côncavo. Os valores correspondem à média  $\pm$  dpm, n=5. \*p<0,05 comparado ao respectivo controle.

## 4.9 Avaliações Biomoleculares

### 4.9.1 Receptor de insulina

A avaliação molecular da fosforilação do receptor de insulina realizada em ratas controle não mostrou diferença entre os músculos do lado direito e esquerdo, como pode ser visto na figura 20.

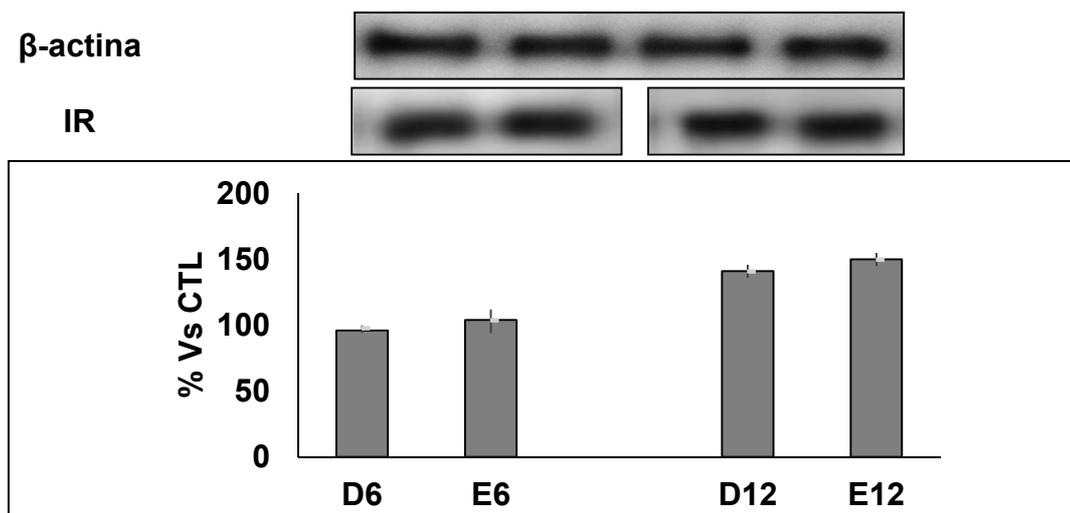


Figura 20. Porcentagem de fosforilação do receptor de insulina na tirosina IB: IR em ratos controle com 6 e 12 semanas. D = lado direito e E = lado esquerdo, 6 e 12 semanas. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

A seguir foi avaliado a fosforilação do receptor de insulina na tirosina, em ratos escolióticos e pode-se verificar que se encontra diminuído na porção côncava, onde os valores apresentaram-se 6% e 12% menor, respectivamente no período de 6 e 12 semanas (figura 21). Tal fato indica que possivelmente alguma fosfatase ou proteína inibidora possa estar diminuindo sua atividade.

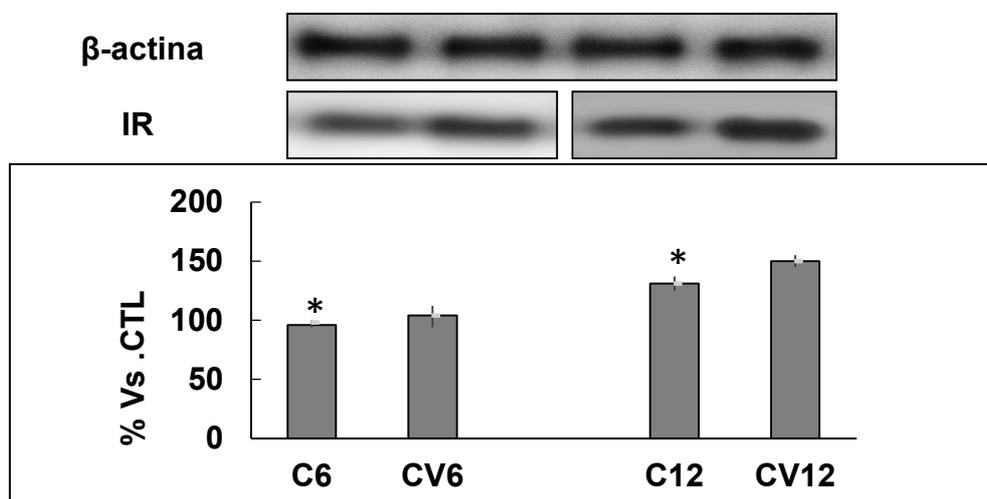


Figura 21. Fosforilação do receptor de insulina na tirosina IB: IR (% Vs CTL) em ratos escolióticos 6 e 12 semanas. C = côncavo e CV = convexo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3, \*p<0,05 se comparado ao lado convexo.

Quando o mesmo tipo de estudo foi direcionado a ratos controle, também não foi verificada diferença significativa (figura 22), similar ao descrito no estudo com fêmeas controle, no entanto, quando se avaliou o grupo de ratos escolióticos foi verificado que a fosforilação do receptor de insulina encontra-se 5% e 8% menor na porção côncava (figura 23) similar ao descrito nas fêmeas, indicando diminuição na sensibilidade insulínica.

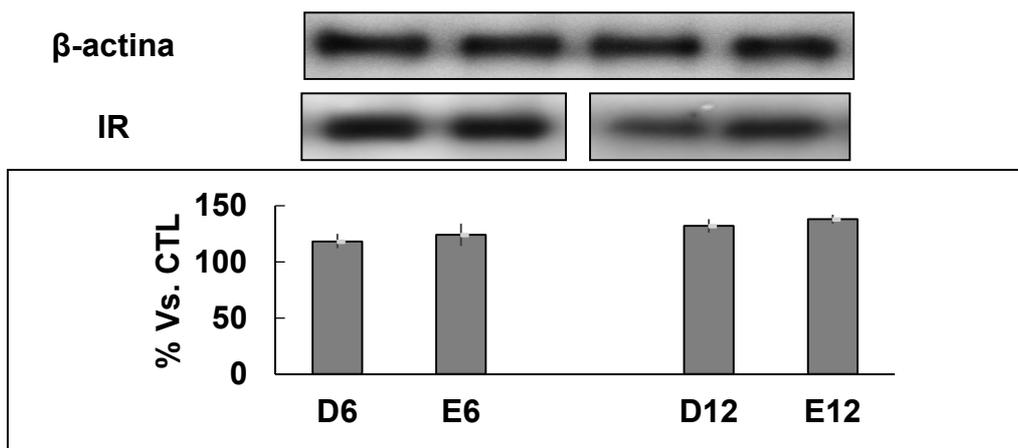


Figura 22. Porcentagem de fosforilação do receptor de insulina na tirosina IB: IR em ratos controle com 6 e 12 semanas. D = lado direito e E = lado esquerdo, 6 e 12 semanas. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

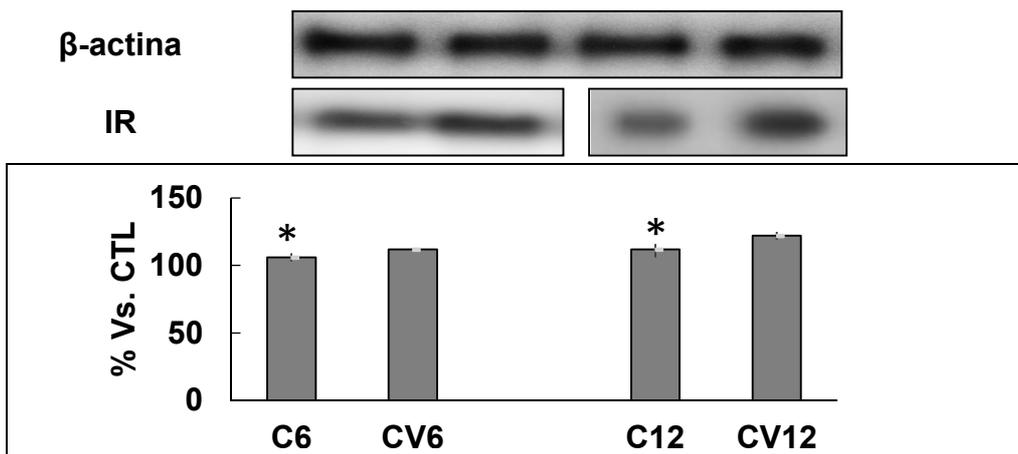


Figura 23. Fosforilação do receptor de insulina na tirosina IB: IR (% Vs. CTL) em ratos escolióticos 6 e 12 semanas. C = côncavo e CV = convexo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3, \* $p < 0,05$  se comparado ao lado convexo.

#### 4.9.2 GLUT 4

A avaliação molecular da fosforilação do receptor de GLUT4, realizada em ratas controle não mostrou diferença entre os músculos do lado direito e esquerdo, como pode ser visto na figura 24.

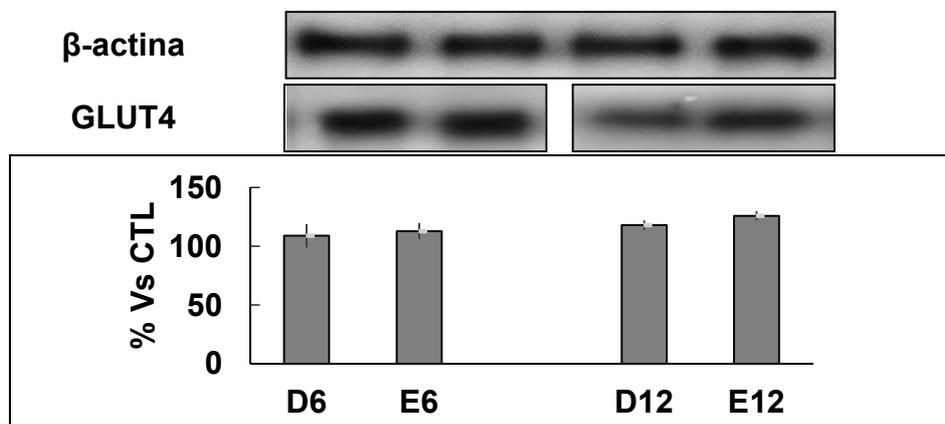


Figura 24. Porcentagem de fosforilação do GLUT 4 em ratas controle com 6 e 12 semanas. D = lado direito e E = lado esquerdo, 6 e 12 semanas. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

A seguir foi avaliado a fosforilação do receptor de GLUT4 em ratas escolióticas, sendo possível verificar que se encontra diminuído na porção côncava, onde os valores apresentaram-se 14% menores, tanto no período de 6 semanas como no de 12 semanas (figura 25).

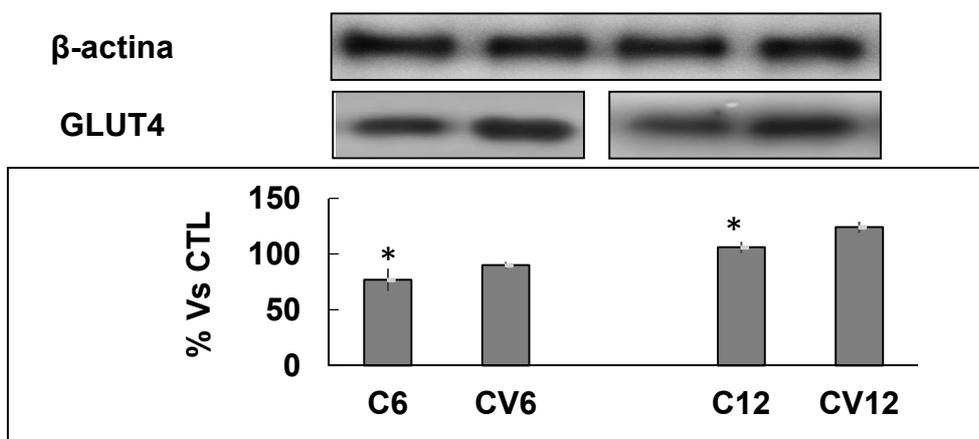


Figura 25. Fosforilação do GLUT 4 (% Vs. CTL) em ratas escolióticas 6 e 12 semanas. C = côncavo e CV = convexo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3. \*p<0,05 se comparado ao lado convexo.

Quando a análise foi realizada em ratos controle, também não foi verificada diferença significativa (figura 26), similar ao descrito no estudo com fêmeas controle, entretanto, quando se avaliou o grupo de ratos escolióticos foi verificado que a fosforilação do receptor de GLUT4 encontra-se 8% e 10% menor na porção côncava (figura 27), redução similar ao descrito nas fêmeas escolióticas.

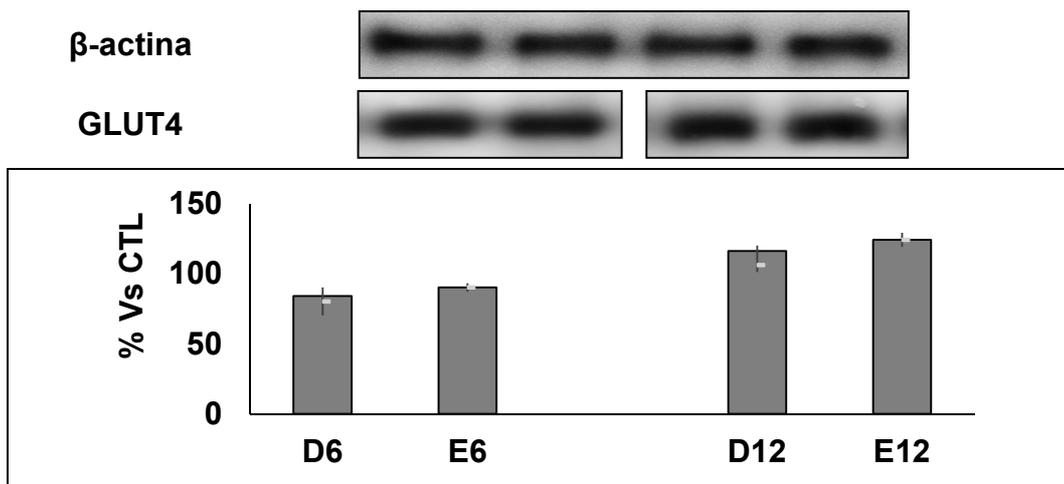


Figura 26. Fosforilação do GLUT 4 (% Vs. CTL) em ratos controle 6 e 12 semanas. D = lado direito e E = lado esquerdo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

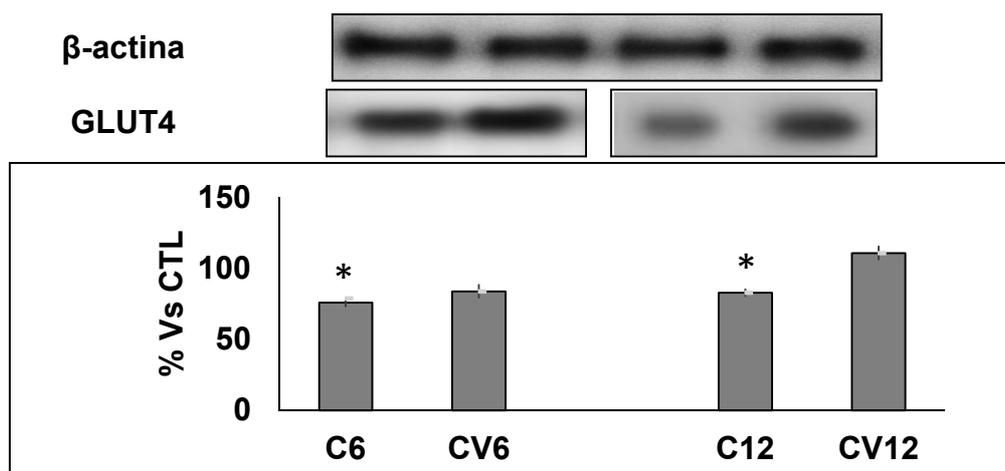


Figura 27. Fosforilação do GLUT 4 (% Vs. CTL) em ratos escolióticos 6 e 12 semanas. C= côncavo e CV = convexo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3. \* $p < 0,05$  se comparado ao lado convexo.

### 4.9.3 mTOR

A avaliação molecular da fosforilação do receptor de mTOR, realizada no grupo controle ratas, não mostrou diferença significativa como mostrado na figura 28.

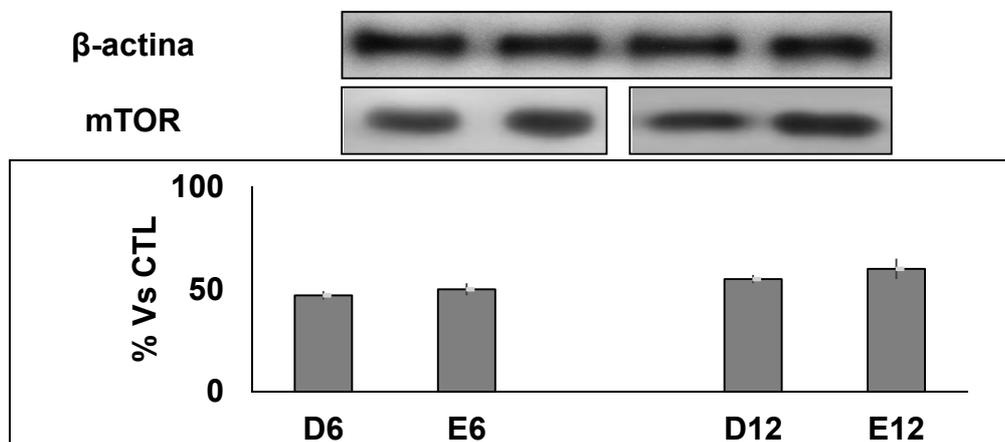


Figura 28. Fosforilação da mTOR (% Vs. CTL ) em ratas controle 6 e 12 semanas. D = direito e E = esquerdo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

Entretanto, quando a mesma avaliação foi realizada em ratas escolióticas mostrou diferença significativa, onde a porção côncava apresentou valores diminuídos de 33% na 6<sup>a</sup> semana e 22% nas 12<sup>a</sup> semana (figura 29).

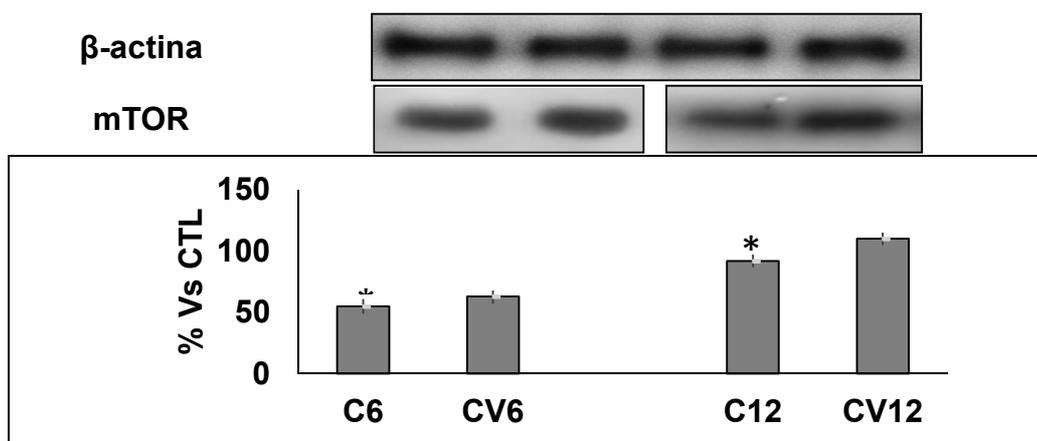


Figura 29. Fosforilação da mTOR (% Vs. CTL) em ratas escolióticas 6 e 12 semanas. C = côncavo e CV = convexo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3. \*p<0,05 se comparado ao lado convexo

Quando a análise foi realizada no grupo controle machos, não foram verificadas alterações (figura 30), porém nos ratos escolióticos houve diferença significativa, sendo observados valores 12% e 16% menores, respectivamente no período de 6 e 12 semanas (figura 31).

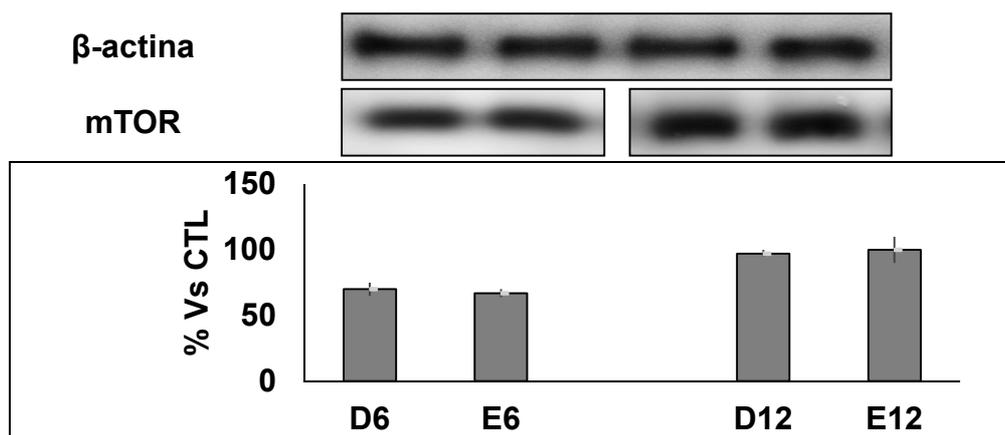


Figura 30. Fosforilação da mTOR (% Vs. CTL) em ratos controle 6 e 12 semanas. D = direito e E = esquerdo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3.

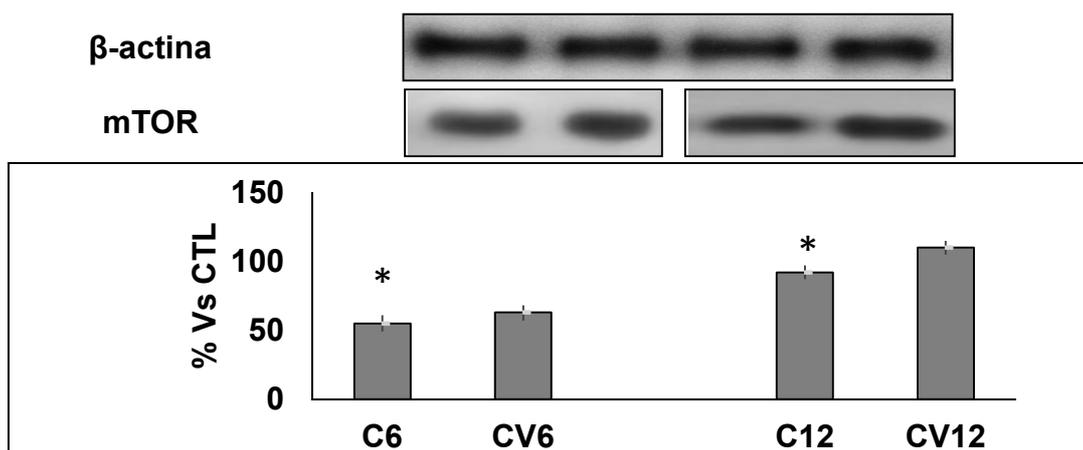


Figura 31. Fosforilação da mTOR (% Vs. CTL) em ratos escolióticos 6 e 12 semanas. C = côncavo e CV = convexo. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, n=3. \* $p < 0,05$  se comparado ao lado convexo.

## 5. DISCUSSÃO

Estudos dos eventos desenvolvidos na escoliose experimental, são de importância impar para se obter informações adicionais ligadas ao processo de indução e consolidação da deformidade, tendo a possibilidade de transposição dos dados em humanos (Zhang et al., 2013; Zaina et al., 2015). Outro importante fator a se considerar, é a constatação que a escoliose não é exclusiva dos humanos e também não ocorre somente na condição da postura bípede, mesmo assim, há modelos extremamente invasivos que estimulam o desenvolvimento da escoliose forçando o animal a se manter na postura bípede (Gorman e Briden, 2009; Liu et al. 2011).

O modelo de indução de escoliose que foi utilizado neste estudo é considerado simples, se comparado a outros modelos experimentais descritos na literatura, e ainda, apresenta caráter não invasivo, tem fácil replicabilidade e baixo custo, fatores favoráveis ao uso em diferentes protocolos de estudo. É importante destacar que a metodologia aqui apresentada se mostrou eficiente para indução da curvatura escoliótica conforme demonstrado por Silva et al. (2012).

Dentro da proposta de realizar a análise em diferentes tempos, foi determinado no presente estudo que a avaliação do processo de indução da curvatura escoliótica fosse realizada após 6 e 12 semanas. Esta proposta foi baseada no fato que Sarwak et al. (1988) terem sugerido que no período de seis semanas a curvatura escoliótica já está implantada, justificando que neste período possivelmente a coluna já esteja calcificada na curvatura, não havendo como dar continuidade no processo de alterações na coluna.

No entanto, em 2008, Silva et al. empenharam-se e desenvolveram uma metodologia não invasiva em forma de coletes (anterior e posterior) e aplicaram da

6<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana, resultando em curvatura escoliótica sinistro convexa. No mesmo estudo, foi demonstrado que a partir da 12<sup>a</sup> semana a curvatura não progride mais e que na sexta semana de indução, caso seja retirado os coletes de indução da curvatura, há possibilidade de retorno as condições de normalidade e redução na curvatura devido a movimentação do animal na caixa, condição que pode possibilitar a recuperação até ângulos médios observados em animais controle. Convém ressaltar, que neste estudo acompanhamos o estudo acima citado, de forma que, os dispositivos foram trocados semanalmente, a fim de acompanhar o desenvolvimento corporal do animal, condição que não é possível em casos cirúrgicos (invasivos).

Tendo como referencial o peso dos animais, foi verificado que os grupos escoliótico machos e fêmeas, tanto 6 quanto 12 semanas, apresentaram peso menor quando comparado ao seu respectivo controle, neste caso não se refere à perda de peso, uma vez que, em nenhum momento os animais escolióticos apresentaram-se com peso corpóreo superior ao controle. Foi avaliado a possibilidade do peso do dispositivo estar influenciando no menor ganho de peso dos animais, no entanto, o peso do colete equivale a apenas 4,3% do peso corporal do animal quer seja nos machos ou nas fêmeas, de modo que seja improvável que esse peso possa ter induzido ao maior gasto energético devido a sustentação do dispositivo.

Baseado no estudo de Ueno et al. (2011), em humanos o peso máximo do material transportado não deve ultrapassar 5% e 10% do peso corporal de crianças em idade pré-escolar e em nível de 1<sup>o</sup> grau, respectivamente, haja visto que é nessa fase que as alterações de ordem patológica podem ser mais facilmente induzidas ou potencializadas. Neste aspecto, o conjunto de coletes, acompanha o

perfil descrito na literatura quanto a relação de peso do instrumento *versus* peso do animal.

No que se refere ao índice de ingesta foi observado diferença entre os grupos avaliados na 11<sup>a</sup> semana de indução escoliótica. No intuito de não induzir estresse nesta fase, a coleta foi realizada antecedendo a 12<sup>a</sup> semana, no entanto, não foi constatada alteração na concentração do peptídeo hipotalâmico NPY, que poderia ser a justificativa do não aumento do peso, uma vez que esses peptídeos são marcadores de ingesta alimentar (Mancini, Halpern, 2002). Este estudo indica que as modificações na ingesta não se referem a mudanças na homeostasia dos peptídeos hipotalâmicos.

É sugestivo o fato do comportamento do peso corporal possa ser originário de alterações no trato gastroentérico ou de modulação nas funções reguladoras dos processos envolvidos na absorção, isso em consideração que a parte posterior do dispositivo exerce pressão na região abdominal. Esta hipótese se embasa no estudo de Al-Jandalet al. (2011), em que os autores sugerem que alterações na absorção intestinal podem interferir diretamente no peso corporal. Mesmo frente a esta proposta, outros estudos devem ser realizados para dirimir esta dúvida.

Baseado no fato dos animais passarem por um processo que promove modificação estrutural na coluna vertebral, optou-se por realizar um estudo comportamental para verificar tanto a locomoção quanto o grau de ansiedade (Prut, Belzung, 2003). Nesta etapa do estudo optou-se por avaliar o deslocamento no teste de campo aberto e não foi constatado modificação comportamental quando comparados os grupos controle e escoliótico, quer seja no grupo macho ou no grupo de fêmeas, assim, frente aos resultados, descarta-se a ação do modelo

enquanto mecanismo restritivo de deslocamento. Convém ressaltar que a capacidade do sistema ósseo atingir seu crescimento máximo depende de fatores hormonais, nutricionais, físicos e das cargas axiais sobre o esqueleto, não descartando que o modelo de indução da curvatura escoliótica possa interferir parcialmente no crescimento do animal.

A seguir e dentro da análise comportamental, foi realizada a avaliação no labirinto em cruz elevada, condição que também não indicou diferença entre os grupos, descartando a possibilidade do processo ser gerador de ansiedade e corroborando com outros estudos do grupo (Silva et al., 2008; Arruda, Silva, Guirro 2008).

Como recurso para análise da coluna vertebral optou-se pelo exame radiológico por ser à base da avaliação e acompanhamento da angulação escoliótica (Navarro et al., 2008; Gotfryd et al., 2011). A fim de obter uma análise fidedigna, no presente estudo foram mensuradas as curvaturas escolióticas com o auxílio do software Alcimagem®. Convém ressaltar que, muito embora Vertovec, Pernus e Likar, (2009), apontem que ainda não há consenso no que diz respeito à quantificação da rotação vertebral, o presente estudo atesta rotação vertebral.

No estudo de Sarwak et al (1988), os autores justificaram a existência de rotação vertebral no modelo animal, ao correlacionarem a curvatura escoliótica com as articulações costovertebrais. Do ponto de vista biomecânico e funcional, a metodologia de indução mostrou-se eficaz, ao passo que tanto o grupo 6 semanas, quanto o grupo 12 semanas apresentaram curvatura escoliótica em “C” sinistroconvexa, em nível toracolombar.

O grupo submetido à indução escoliótica por 6 semanas, apresentou angulação que não se manteve após a retirada do dispositivo. O estudo de Sarwak et al., (1988) sugere a manutenção da angulação escoliótica após 6 semanas, mas é importante ressaltar que os autores utilizaram metodologia invasiva e atestaram que a severidade da curvatura é diretamente proporcional ao tempo de indução.

Um diferencial relevante a destacar, é que a metodologia aplicada por Arruda, Silva e Guirro (2008) e replicada no presente estudo é simples e permite graduar a angulação da curvatura, por meio da aproximação das cinturas escapular e pélvica, de modo que, esse procedimento se desenvolve em um tempo mínimo de 6 semanas, mas necessita de um maior tempo para se estabelecer, sendo determinado o mínimo de 12 semanas.

Cunha, Rocha e Cunha (2009), demonstraram que o padrão ouro na mensuração da escoliose é o método de *Cobb*, que verifica o ângulo da curvatura a partir do exame radiológico de maneira simples. No entanto, visto o tamanho, bem como a morfologia das estruturas do animal, no presente estudo optou-se por usar o método de *Ferguson* com o auxílio do *software* ALCimagem 2.1®, visando oferecer menor margem de erro.

Sevastikoglou e Bergquist (1969) realizaram um estudo para avaliar a precisão de métodos radiológicos no registro da escoliose e não houve nenhuma diferença significativa entre as mensurações realizadas pelos métodos de *Cobb* e o de *Ferguson*.

Referindo-se a angulação da curvatura escoliótica, estudos apontam que escolioses maiores que 45°, são consideradas graves e não apresentam resultados

satisfatórios frente à intervenção não invasiva, sendo assim, a indicação é cirúrgica (Zaborowska-sapeta et al., 2011; Sarwahi et al., 2011).

Na análise da curvatura escoliótica foi verificado que a curvatura de maior intensidade ocorreu nas machos se comparado as fêmeas, fato que pode ter relação direta com os ajustes neuroendócrinos descritos na literatura em humanos, onde os hormônios sexuais auxiliam no equilíbrio homeostático da musculatura que sustenta a coluna. Mesmo frente a um recente estudo realizado com humanos que reiterou a prevalência de escoliose em meninas, sugere-se que as ratas ainda estavam em fase de maturação sexual e a progressão da curvatura possa ter sido influenciada por este fator (Khaymina et al., 2012). Cabe ressaltar que, o aspecto multifatorial que induz a curvatura escoliótica bem como a razão da prevalência em mulheres, ainda não está definido.

Quando se realiza uma investigação do perfil metabólico, as reservas glicogênicas se revestem de fundamental importância, uma vez que, pequenas reservas são indicativos de fadiga. O aspecto metabólico da musculatura também foi alvo de investigações, sendo que nos machos as reservas glicogênicas dos músculos peitorais, intercostais, abdominal e diafragma do grupo escoliótico apresentaram reservas em média de 26% menores. Convém ressaltar que o hemitórax esquerdo (convexo) diferenciou-se da porção côncava devido a tensão passiva gerada pelo distanciamento entre as cinturas escapular e pélvica induzido pelo modelo experimental.

A mesma análise de fundo metabólico foi realizada no grupo de fêmeas e mostrou que as reservas foram comprometidas em média de 28%, sendo o efeito mais significativo do que observado no grupo de machos. Este dado mostra que as vias metabólicas das fêmeas foram mais afetadas e expressa uma maior

susceptibilidade das fêmeas a disfunção da coluna vertebral, de uma forma geral não podemos descartar a hipótese que haja desuso no processo de indução da escoliose, gerando redução na atividade das vias de formação das reservas glicogênicas.

Estudos de cunho metabólico realizados em modelos experimentais de desuso como a desnervação ou imobilização verificaram reservas glicogênicas expressivamente baixas, se comparado a condição de normalidade, indicando comprometimento na formação destas reservas, dados que acompanham publicações que demonstraram redução na atividade da enzima glicogênio sintetase e no sistema PKC, bem como no controle das vias responsáveis pela formação das reservas glicogênicas (Norby et al., 2012; Bongers et al., 2013).

Com base em estudo sobre escoliose em caráter experimental, Bylund et al. (1987), induziram escoliose em coelhos e constaram alterações mioopáticas no lado côncavo e neuropáticas no lado convexo. Os animais escolióticos ainda apresentaram menor porcentagem de fibra tipo I em ambos os lados, sendo que essa alteração na tipagem pode acompanhar a deformidade. É importante salientar, que no estudo supracitado a metodologia foi invasiva.

No estudo de Werneck et al. (2008), a escoliose experimental foi desenvolvida por meio da costotransversectomia, sendo que a vertebra T8 foi indicada como vértebra vértice. Nos achados histoquímicos e morfológicos, destaca-se que na convexidade houve proliferação de conjuntivo e reação inflamatória. Dessa forma, os autores apontam que frente ao quadro escoliótico, o tecido muscular pode sofrer alterações importantes e isso pode ter influenciado no comportamento das reservas glicogênicas dos grupos escolióticos de ambos os grupos avaliados no presente estudo.

Do mesmo modo, outros estudos tinham sugerido que indivíduos escolióticos podem apresentar anormalidade na tipagem das fibras musculares, bem como no metabolismo muscular. No entanto, ainda há dificuldade em estabelecer parâmetros no aspecto metabólico, assim, tal condição pode inferir nas dinâmicas energéticas da musculatura, com efeito na eficiência neuromuscular, condição apontada por estudos de eletromiografia (Gaudreault et al., 2005).

No mesmo sentido de investigação, Bassini et al. (2008) utilizaram a eletromiografia de superfície para avaliar a eficiência neuromuscular e fadiga muscular nos músculos extensores lombares de indivíduos com escoliose. Os autores observaram que indivíduos escolióticos apresentaram menor eficiência neuromuscular e menor força (42,6%) se comparada ao grupo controle. Surpreendentemente, o grupo escoliótico apresentou simetria na ativação neuromuscular entre os lados direito e esquerdo (côncavo/convexo), seguido de maior resistência à fadiga.

Com relação a análise de proteína total da musculatura do grupo de machos e fêmeas, foi observado que o grupo escoliótico apresentou menores concentrações se comparado com o controle, no entanto, a intensidade foi menor no grupo de fêmeas se comparado aos machos. Os dados aqui apresentados podem ter relação com a razão comprimento/tensão devido ao fato de um músculo alongado (convexo) ser menos comprometido ou ainda estar em condição favorável a síntese proteica, entretanto, necessariamente não significa que essa condição é favorável ao melhor aporte energético (Aquino et al., 2007; Udaka et al., 2008).

Há muito tempo tem sido relatado que alterações no comprimento muscular estão associadas a deslocamentos da curva comprimento-tensão. O estudo de Tabary et al. (1972) sugeriu que o tecido muscular de animais, quando

imobilizados em posição encurtada apresentam redução de 40% do número de sarcômeros em série, e se immobilizados em posição alongada apresentam aumento de 19% do número de sarcômeros em série. Este dado reitera a diferença na concentração de proteínas totais entre os lados côncavo e convexo.

No contexto da indução da curvatura escoliótica julga-se que o estímulo para a hipotrofia está instalado, seja no lado côncavo ou no lado convexo. A relação comprimento/tensão tanto do lado côncavo quanto do lado convexo está alterada, comprometendo a capacidade de geração de força dos dois lados, acentuando a perda de força e massa muscular. No lado convexo, pelo princípio da adaptabilidade, o tecido muscular terá um estímulo para desenvolver a hiperplasia (aumento dos sarcômeros em série) e hipotrofia (redução da massa/volume por desuso). Como a concentração de proteínas totais foi menor na porção côncava, é sinal que houve hipotrofia, podendo haver perda dos sarcômeros devido ao encurtamento.

Na década de 90, Joe (1990) induziu escoliose em ratos, por meio da estimulação elétrica, condição que resultou em curvatura de 18°, ao fim de três semanas de estimulação. Observou-se que no lado estimulado (côncavo), houve aumento significativo de fibras tipo I, sendo que a convexidade apresentou maior quantidade de fibras do tipo II. É sugestivo o fato de que esta condição possa ter sido acompanhada de alteração metabólica, conforme demonstrado no presente estudo.

No intuito de caracterizar o comportamento molecular da musculatura paravertebral na região côncava e convexa, foram avaliados parâmetros indicativos da atividade metabólica. Iniciou-se o estudo avaliando a população de receptores de insulina e não foi verificada diferença entre as duas regiões na condição controle

tanto machos quanto fêmeas. No mesmo aspecto de análise, a avaliação realizada no grupo escoliótico mostrou que a musculatura da região côncava apresentou menor população dos receptores insulínicos, se comparada ao lado convexo, efeito observado nos machos, mas em maior intensidade no grupo de fêmeas.

A redução na população de receptores insulínicos é um evento que pode estar fundamentado em múltiplos fatores tais como o processo de indução da curvatura escoliótica, onde este modelo por atuar restringindo a movimentação muscular, propiciando o desuso e a conseqüente redução na população de receptores principalmente na região côncava. Frente a possibilidade de ser expressivo o desuso, sabe-se que este pode gerar alterações na homeostasia metabólica caracterizadas pela redução na atividade das vias insulínicas e comprometimento na dinâmica de captação e metabolização da glicose, condição que induz a formação de menores reservas de glicogênio, redução na expressão gênica dos transportadores GLUT 1 e GLUT 4 comprometendo o suprimento energético e desencadeando o processo de hipotrofia (Dow et al., 2006).

Na avaliação da população de transportadores de glicose GLUT 4 não foi observado diferenças entre os grupos controles (machos e fêmeas), por outro lado houve redução em ambos os grupos escolióticos, no entanto, nas fêmeas, a população foi significativamente menor. Possivelmente a menor população de GLUT 4 reflita nas menores reservas glicogênicas, indicando menor captação da glicose, fato que associa-se com a menor população de receptores de insulina, uma vez que a captação de glicose bem como a população de GLUT 4 inserido na membrana é modulado pelo sinal insulínico (Machado, Schaan, Seraphim, 2006).

Ainda na via insulínica, a avaliação da população da enzima mTOR seguiu o perfil demonstrado nas avaliações da população de receptores de insulina

e GLUT4, sendo expressivamente menor no lado côncavo nos dois grupos, porém, mais significativo nas fêmeas. Se faz necessário ressaltar que, tem sido proposto que a atrofia é um evento multifatorial que tem relação direta com as alterações enzimáticas, mais especificamente representada pela redução expressiva na eficiência enzimática na via PI3K/Akt, p70S6K e mTOR (MacDonald et al., 2014).

Dentro do âmbito gênico/molecular e exemplificando a multifatorialidade da escoliose, a literatura traz novas hipóteses que buscam justificar a ocorrência desta patologia, merecendo destaque: 1) As relações entre a redução na expressão gênica de receptores de IGF1 e a severidade da curvatura escoliótica (Liu et al., 2009); 2) A redução na biogênese mitocondrial contribuindo para as alterações metabólicas musculares observadas e descritas nos pacientes com escoliose ( Ripolone et al., 2015 ); 3) A fibrose tanto no endomísio quanto no perimísio com maior severidade no lado côncavo (Wajchenberg et al., 2015). 4) A elevação na concentração do hormônio osteopontina contribuindo para a determinação e progressão da curvatura escoliótica (Xie et al., 2015).

Por fim, o conhecimento das alterações quimiometabólicas, morfológicas e moleculares das estruturas que são influenciadas pela escoliose, pode ser uma ferramenta importante para o refinamento dos protocolos permitindo influenciar diretamente na qualidade de vida de pacientes que apresentam esta importante deformidade.

## **6. CONCLUSÃO**

O modelo de indução de escoliose foi eficiente na indução da curvatura e o estudo mostrou que as fêmeas tiveram maior susceptibilidade a deformidade da coluna. As avaliações metabólicas e moleculares mostraram que na escoliose sistemas ligados a via insulínica estão comprometidos, sendo mais significativos na parte côncava, dessa forma torna-se sugestivo o fato que estas alterações fazem parte do rol de sistemas que corroboram para o enfraquecimento da musculatura e determinação da severidade da curvatura.

Outros estudos se fazem necessários para identificar o potencial de protocolos da fisioterapia na minimização destas alterações, visando o bem estar de indivíduos acometidos por esta patologia.

## REFERÊNCIAS

Aleissa S, Parsons D, Grant J, Harder J, Howard J. Deep wound infection following pediatric scoliosis surgery: incidence and analysis of risk factors. *Can J Surg*. 2011;54(4):263-9.

Al-Jandal NJ, Whittamore JM, Santos EM, Wilson RW. The influence of 17  $\beta$ -estradiol on intestinal calcium carbonate precipitation and osmoregulation in seawater-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*. 2011 Aug 15; 214(16): 2791-8.

Aquino CF, Freire MTF, Neves NM, Ferreira PCA, Fonseca ST. Análise da confiabilidade de um método de mensuração do ângulo de pico de torque ativo dos isquiossurais. *Rev Bras Fisioter*. 2007; 11(2): 169-175.

Arruda EJ, Silva CA, Guirro RRJ. Avaliação das reservas glicogênicas dos músculos peitorais e paravertebrais após indução de escoliose em ratos. In: 6º Mostra Acadêmica da UNIMEP - XVI Congresso de Iniciação Científica; 2008. Piracicaba. Anais da 6º Mostra Acadêmica da UNIMEP, 2008.

Bassini E, Candotti CT, Pasini M, Melo M, La Torre M. Avaliação da ativação neuromuscular em indivíduos com escoliose através da eletromiografia de superfície. *Rev Bras Fisioter*. 2008; 12(1): 13-9.

Bettany-Saltikov J, Parent E, Romano M, Villagrasa M, Negrini S. Physiotherapeutic scoliosis-specific exercises for adolescents with idiopathic scoliosis. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2014;50(1):111-21.

Bettany-Saltikov J, Weiss HR, Chockalingam N, Taranu R, Srinivas S, Hogg J, Whittaker V, Kalyan RV, Arnell T. Surgical versus non-surgical interventions in people with adolescent idiopathic scoliosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015, Issue 4, CD010663.

Bongers KS, Fox DK, Ebert SM, Kunkel SD, Dyle MC, Bullard SA, Dierdorff JM, Adams CM. Skeletal muscle denervation causes skeletal muscle atrophy through a pathway that involves both Gadd45a and HDAC4. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013, 305(7):E907-15

Bonorino KC, Borin GS, Silva AH. Tratamento para escoliose através do método iso-stretching e uso de bola suíça. *Cinergis.* 2007; 8(2): 1-5.

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72: 248-54.

Bylund P, Jansson E, Dahlberg E, Eriksson E. Muscle fiber types in thoracic erector spinae muscles. Fiber types in idiopathic and other forms of scoliosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1987 Jan; 214: 222-8.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;49(1):171-176.

Cunha ALLM, Rocha LEM, Cunha LAM. Método de Cobb na escoliose idiopática do adolescente: avaliação dos ângulos obtidos com goniômetros articulados e fixos. *Coluna/Columna.* 2009; 8(2): 161-170.

Dickson R, Leatherman KD. The management of spinal deformities. London: Wright. 1988: 1-54.

Dow DE, Carlson BM, Hassett CA, Dennis RG, Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscle of rats maintains mass and force, but not. *Restor Neurol Neurosci.* 2006; 24 (1): 41-54.

Durmała J, Blicharska I, Drosdzol-Cop A, Skrzypulec-Plinta V. The Level of Self-Esteem and Sexual Functioning in Women with Idiopathic Scoliosis: A Preliminary Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2015 Aug; 12(8): 9444–53.

Evaniew N, Devji T, Drew B, Peterson D, Ghert M, Bhandari M. The surgical management of scoliosis: a scoping review of the literature. *Scoliosis*. 2015 Jan ;10:1.

Ferreira DMA, Fernandes CG, Camargo MR, Pachioni CAS, Fregonesi CEPT, Faria CRS. Spine evaluation: Determination of the relationship between thoracic spinal deformity and sagittal curves by a noninvasive method. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*. 2010;12(4):282-289.

Gaudreault N, Arsenault AB, Larivière C, DeSerres SJ, Rivard CH. Assessment of the paraspinal muscles of subjects presenting an idiopathic scoliosis: an EMG pilot study. *BMC Musculo skelet Disord*. 2005 Mar; 10: 6:14.

Gorman KF, Breden F. Idiopathic-type scoliosis is not exclusive to bipedalism. *Med Hypotheses*. 2009 Mar; 72(3): 348-52

Gorman KF, Julien C, Moreau A. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2012;21(10):1905-19.

Gotfryd AO, Franzin FJ, Raucci G, Carneiro Neto NJ, Poletto PR. Tratamento cirúrgico da escoliose idiopática do adolescente utilizando parafusos pediculares: análise dos resultados clínicos e radiográficos. *Coluna/Columna*. 2011; 10(2): 91-96.

Heriksen EJ, Rodnick KJ, Mondon CE, James DE, Holloszy JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol*. 1997; 70: 2322-2327

Hershkovic O, Friedlander A, Gordon B, Arzi H, Derazne E, Tzur D, Shamiss A, Afek A. Association between body mass index, body height, and the prevalence of spinal deformities. *J Spine*. 2014;14(8):1581-7.

Janssen MM, de Wilde RF, Kouwenhoven JW, Castelein RM. Experimental animal models in scoliosis research: a review of the literature. *Spine J.* 2011 Apr; 11(4): 347-58.

Joe T. Studies of experimental scoliosis produced by electric stimulation. *Nihon Ika Daigaku Zasshi.* 1990; 57(5): 416-426.

Kasuga K. Experimental scoliosis in the rat spine induced by binding the spinous processes. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 1994; 68(9): 789-807.

Khaymina T, Avaliani T, Dudin M, Pinchuk D. Neurohumoral regulation in children with idiopathic scoliosis. *Stud Health Technol Inform.* 2012;176:168-73.

Karimi M, Kavyani M. Scoliosis curve analysis with Milwaukee orthosis based on Open SIMM modeling. *J Craniovertebr Junction Spine.* 2015;6(3):125–129.

Kisner C., Colby LA. *Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas.* 4. ed. São Paulo: Manole; 2005.

Komeili A, Westover L, Parent EC, El-rich M, Adeeb S. Monitoring for idiopathic scoliosis curve progression using surface topography asymmetry analysis of the torso in adolescents, *The Spine Journal.* 2015;15(4):705-712.

Koumbourlis AC. Scoliosis and the respiratory system. *Paediatric Resp Rev.* 2006;7(2):152 – 60.

Kouwenhoven J, Castelein R . The Pathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis: Review of the Literature. *J Spine,* 2008;33(26):2898-2908.

Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.

Liu L, Zhu Y, Han X, Wu Y. The creation of scoliosis by scapula-to-contralateral ilium tethering procedure in bipedal rats: a kyphoscoliosis model. *Spine (PhilaPa 1976)*. 2011 Aug; 36(17): 1340-9.

Liu WJ, Qiu Y, Chen ZJ, Liu Z, Shu H, Wang XH, Sun C. Association between insulin-like growth factor-1 receptor gene polymorphisms and with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2009, 1;47(23):1813-6.

Lonstein JE. Scoliosis: surgical versus nonsurgical treatment. *Clin Orthop Relat Res* 2006;443(1):248–59.

Macdonald EM, Andres-Mateos E, Mejias R, Simmers JL, Mi R, Park JS, et al. Denervation atrophy is independent from Akt and mTOR activation and is not rescued by myostatin inhibition. *Dis Model Mech*. 2014; 7(4): 471-8.

Machado UF, Schaan BD, Seraphim P M. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50/2:177-189

Machida M, Saito M, Dubousset J, Yamada T, Kimura J, Shibasaki K. Pathological mechanism of idiopathic scoliosis: experimental scoliosis in pinealectomized rats. *Eur Spine J*. 2005; 14(9): 843-8.

Mancini MC, Halpern A. Aspectos Fisiológicos do Balanço Energético. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(3):230-248)

Marques AP. Escoliose tratada com reeducação postural global. *Rev Fisioter Univ São Paulo*. 1996;3(1/2):65-68.

Navarro MVT, Leite HJD, Alexandrino JC, Costa ED. Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. *Hist. cienc.saude-Manguinhos*. 2008; 15(4): 1039-1047.

Nogami H, Terashima Y, Tamaki K. Congenital kyphoscoliosis and spinal cord lesion produced in the rat by beta-aminopropionitrile. *Teratology*. 1977; 16 (3): 351-377.

Norrby M, Evertsson K, Fjällström AK, Svensson A, Tågerud S. Akt (protein kinase B) isoform phosphorylation and signaling downstream of mTOR (mammalian target of rapamycin) in denervated atrophic and hypertrophic mouse skeletal muscle. *J Mol Signal*. 2012, 17(1): 1186 - 1287.

Oyama J, Murai I, Kanazawa K, Machida M. Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels. *J Pineal Res*. 2006; 40(3): 219-224.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. 2003, (28): 3–33.

Ripolone M, Ronchi D, Violano R, Vallejo D, Fagiolari G, Barca E, Lucchini V, Colombo I, Villa L, Berardinelli A, Balottin U, Morandi L, Mora M, Bordoni A, Fortunato F, Corti S, Parisi D, Toscano A, Sciacco M, DiMauro S, Comi GP, Moggio M. Impaired Muscle Mitochondrial Biogenesis and Myogenesis in Spinal Muscular Atrophy. *JAMA Neurol*. 2015 Jun;72(6):666-75

Rito C, Marques E, Filipe F. Congenital scoliosis: diagnosis and treatment. *Rev Soc Port Med Fis Reab*. 2012;21(1):40-47.

Romano M, Negrini A, Parzini S, Tavernaro M, Zaina F, Donzelli S, Negrini S. SEAS (Scientific Exercises Approach to Scoliosis): a modern and effective evidence based approach to physiotherapeutic specific scoliosis exercises. *Scoliosis*, 2015;10(3):1-19.

Royce JT. On the construct validity of open field measures. *Psychol Bull*. 1977;84: 1098-1106.

Sarwahi V, Wollowick AL, Sugarman EP, Horn JJ, Gambassi M, Amaral TD. Minimally invasivescoliosis surgery: an innovative technique in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis*. 2011 Aug 11; 6: 16.

Sarwark JF, Dabney KW, Salzman SK, Wakabayashi T, Kitadai HK, Beauchamp JT, Beckman AL, BunnellWP. Experimentalscoliosis in the rat. I. Methodology, anatomicfeatures and neurologic characterization. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1988 May; 13(5): 466-71.

Sevastikoglou JA, Bergquist E. Evaluation of the reliability of radiological methods for registration of scoliosis. *Acta Orthop Scandinavian*. 1969; 40: 608-613.

Silva CA, Guirro RRJ, Fonseca W, Arruda EJ, Grasso DO. Assessment of rat behavior with induced scoliosis by polyvinilchoride vest. *Jour Chin Clinic Med*. 2008; 3(11): 621-626.

Silva CA, Guirro RRJ, Arruda EJ, Delfino GB. Proposal of non-invasive experimental model to induce scoliosis in rats. *Rev Bras Fisioter*. 2012; 16(3):254-60.

Silva FE, Lenke LG. Adult degenerative scoliosis: evaluation and management. *J Neurosurg*. 2010;28(2):E1.

Siu L, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970 Feb; 28(2): 234-6.

Souza FI, Di Ferreira RB, Labres D, Elias R, Sousa APM, Pereira RE. Epidemiologia da escoliose idiopática do adolescente em alunos da rede pública de Goiânia – GO. *Acta Ortop Bras*. 2013;21(4):223-5.

Stokes IA, Spence H, Aronsson DD Kilmer, N. Mechanical Modulation of Vertebral Body Growth: Implications for Scoliosis Progression. *Spine J*. 1996;21(10):1162-7.

Stokes IA. Analysis of symmetry of vertebral body loading consequent to lateral spinal curvature. *Spine*. 1997;22(21): 2495-2503.

Stokes IA, Gwadera J, Dimock A, Aronsson DD. Mechanical modulation of vertebral and tibial growth: diurnal versus full-time loading. *Stud Health Technol Inform.* 2002; 91: 97-100.

Tanaka H, Kimura Y, Ujino Y. The experimental study of scoliosis in bipedal rat. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1982; 101(1): 1-27.

Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol.* 1972; 244: 231-44.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.

Tribastone F. Tratado de exercícios corretivos: aplicados à reeducação motora postural. São Paulo. Ed. Manole. 2001;15:213-216.

Ueno M, Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Shintani R, et al. A 5-year epidemiological study on the prevalence rate of idiopathic scoliosis in Tokyo: school screening of more than 250,000 children. *J Orthop Sci.* 2011 Jan; 16(1):1-6.

Udaka J, Ohmori S, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, et al. Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization. *J Gen Physiol.* 2008 Jan;131(1):33-41.

Vertovec T; Pernus F; Likar B. A review of methods for quantitative evaluation of axial vertebral rotation. *Eur Spine J.* 2009; 18(8): 1079–1090.

Wajchenberg M, Martins DE, Luciano Rde P, Puertas EB, Del Curto D, Schmidt B, Oliveira AB, Faloppa F. Histochemical analysis of paraspinal rotator muscles from patients with adolescent idiopathic scoliosis: a cross-sectional study. *Medicine (Baltimore).* 2015 Feb;94(8):e598.

Weinstein SL, Dolan LA, Spratt KF, et al. Saúde e função de pacientes com escoliose idiopática não tratada: um estudo da história natural de 50 anos. *JAMA* 2003;289:559-67.

Werneck LC, Cousseau VA, Graells XS, Werneck MC, Scola RH. Muscle study in experimental scoliosis in rabbits with costotransversectomy: evidence of ischemic process. *Eur Spine J.* 2008 May; 17(5): 726-33.

Xie N, Li M, Wu T, Liu J, Wang B, Tang F. Does elevated osteopontin level play an important role in the development of scoliosis in bipedal mice? *Spine J.* 2015 Jul 1;15(7):1660-4.

Zaborowska-Sapeta K, Kowalski IM, Kotwicki T, Protasiewicz-Fałdowska H, Kiebzak W. Effectiveness of Chêneau brace treatment for idiopathic scoliosis: prospective study in 79 patients followed to skeletal maturity. *Scoliosis.* 2011; 6(1): 2.

Zaina F, Romano M, Knott P, de Mauroy JC, Grivas TB, Kotwicki T, Maruyama T, O'Brien J, Rigo M, Negrini S. Research quality in scoliosis conservative treatment: state of the art. *Scoliosis.* 2015, 11: 10 – 21.

Zhang H, Wang C, Wang W, Wu Z, Qiu G. Novel experimental scoliosis model in immature rat using nickel-titanium coil spring. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013, 1;38 (19): E1179-88.

---

<sup>i</sup> Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005.

---

Piracicaba, 14 de fevereiro de 2014.

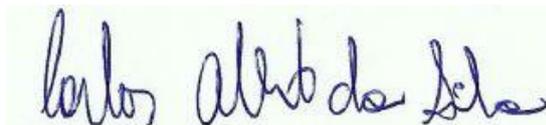
De: Comissão de Ética no Uso de Animais

Ref.: Aprovação de adendo a protocolo de pesquisa

### 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 projeto intitulado “Indução de escoliose em ratos com órtese de PVC” com protocolo intitulado “Caracterização do processo de Indução de escoliose em ratos: estudos em machos e fêmeas. ”analisado por esta comissão.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva  
Presidente do CEUA-UNIMEP