

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Avaliação das Proteínas Musculares Fosforiladas, da Condição Cardíaca e  
Pulmonar de Ratos com Escoliose

VÍTOR ALEXANDRE PEZOLATO  
2014

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
VÍTOR ALEXANDRE PEZOLATO

AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS MUSCULARES  
FOSFORILADAS, DA CONDIÇÃO CÁRDIACA E  
PULMONAR DE RATOS COM ESCOLIOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Neuroplasticidade e Desenvolvimento Neuromotor.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

PIRACICABA  
2014

Esse trabalho é dedicado para Deus, para minha família, minha namorada, a todos os indivíduos que sofrem com a escoliose e a todos os pesquisadores que por ventura, possam utilizar as informações desta obra como base para novas descobertas.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus, cujo é o meu protetor e o promovedor de cada conquista realizada.

Tenho uma eterna gratidão ao Professor Doutor Carlos Alberto da Silva, o qual abriu meus olhos para o mundo científico, me acolheu em seu grupo de pesquisa e me promoveu experiências jamais imaginadas. Ainda, se não fosse pela admiração e pelo contato afetivo e intelectual com o Carlos, meu caminho hoje seria completamente diferente. Assim, ele é meu mestre na Vida, meu amigo, meu guia, um obrigado de coração Doutor.

AO Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP), juntamente com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), meu muitíssimo Obrigado.

Pelo amor de cada dia, pelo acolhimento em qualquer momento ou situação, pelo apoio independente de qualquer dificuldade, agradeço a minha família por estar ao meu lado nessa vida.

Companheira de todos os momentos, incentivadora, fonte de inspiração e dedicação, agradeço a Júlia de Moraes Azanha, pessoa indispensável em minha vida, a qual se mostra maravilhosa em todos os sentidos.

Durante o programa de pós graduação fui abençoado com Professores, os quais me auxiliaram não a ter conhecimento, mas a desenvolvê-lo e criar um senso crítico das situações científicas e sociais, eu agradeço muito a vocês.

Todos meu amigos, pessoas maravilhosas com paz no coração, que me mostraram diferentes alternativas e me ajudaram incansáveis vezes, irei agradecer vocês todos os dias.

Expresso minha gratidão à todos os funcionários da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), por promoverem um excelente ambiente de pesquisa e desenvolvimento intelectual.

Ao final, agradeço a todos que fizeram parte da minha vida, pois cada gesto me auxiliou a chegar nesse momento.

“Milhares de velas podem ser acesas de uma única vela, e a vida da vela não será encurtada. Felicidade nunca diminui ao ser compartilhada.”

Buda

## RESUMO

Escoliose é a condição caracterizada pela disfunção da coluna vertebral em caráter tridimensional, sendo que afeta crianças e adolescentes no mundo todo. Caso não seja tratada desde o início, torna-se uma condição altamente incapacitante. O objetivo do presente estudo foi induzir escoliose em ratos por meio de metodologia não invasiva, a fim de se conhecer as alterações angulares da coluna, o comportamento metabólico que acompanham o quadro escoliótico, bem como o perfil proteico das enzimas fosforiladas mTOR, AKT, P70S6K, IRS-1 e AMP, além da densidade alveolar e padrões eletrocardiográficos. Os animais foram distribuídos em grupos (n=10), a saber: controle e escoliótico. Os animais escolióticos receberam o dispositivo indutor, que foi trocado semanalmente até o fim do período de indução de 12 semanas. Foi realizada inclinação e flexão para o lado direito, formando a curvatura em “C”, que foi avaliada em exames radiológicos. O comportamento elétrico do coração foi avaliado em exame eletrocardiográfico e o glicogênio muscular pelo método do fenol sulfúrico. Houve análise histológica do tecido pulmonar e do músculo paravertebral. A fosforilação das enzimas AKT, MAP, mTOR e P70S6K também foram avaliadas e após a revelação das autorradiografias, as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica. Os dados passaram pelo tratamento estatístico, iniciando pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk seguido da análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) e teste de Sidak. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5%. Os resultados mostraram que o peso corporal médio dos animais escolióticos foi 18% menor comparado aos animais controles. Em relação à angulação da escoliose, o grupo escoliótico apresentou angulação de 56° acompanhado de um desvio de 11° no eixo elétrico cardíaco, sem alteração funcional na dinâmica cardíaca. Na avaliação metabólica, o grupo escoliótico comparado ao controle, apresentou alteração significativa nas reservas glicogênicas com maior intensidade na convexidade, onde os músculos paravertebrais foram comprometidos de forma mais severa, o mesmo ocorreu com a concentração de proteínas totais. Em relação a densidade da área alveolar, o grupo escoliótico demonstrou valores significativamente inferiores, algo que não ocorreu em relação a quantidade de fibras do músculo paravertebral. O perfil da fosforilação das enzimas da via insulínica seguiu o perfil de modificações nas reservas glicogênicas, bem como das proteínas totais. Conclui-se que a escoliose 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.

**Palavras-Chave:** Escoliose, ratos, insulina, músculo, metabolismo.

## ABSTRACT

Scoliosis is a condition characterized by dysfunction of the spine in three-dimensional character, and affects children and adolescents worldwide. If not treated early, it is highly disabling condition. The aim of this study was to induce scoliosis in rats using noninvasive methodology, in order to know the angular changes of the spine, the metabolic behavior that accompany the scoliotic framework as well as the protein profile of phosphorylated enzyme mTOR, AKT, p70S6K, IRS-1, AMP and electrocardiographic profile. The animals were divided into groups (n = 10), namely: control and scoliotic. The scoliotic animals received the inductor device, which was changed weekly until the end of the induction period of 12 weeks. Inclination and bending to the right was made, forming the curvature, which was evaluated in radiological examinations. The electrical behavior of the heart was assessed by electrocardiographic examination and muscle glycogen by the phenol sulfuric method. There histological analysis of lung tissue and paravertebral muscle. Phosphorylation of AKT, AMPK, mTOR and p70S6K enzymes were also evaluated and after the revelation of the autoradiographs, the identified bands were quantified by densitometry. The data passed through the statistical treatment, starting with the Shapiro-Wilk normality followed by analysis of variance two-way (two-way ANOVA) and Sidak test. In all calculations a critical level of 5% was set. The results showed that the average body weight of scoliotic animals was 18% lower compared to the control animals. Regarding the angle of scoliosis, the scoliotic group showed angulation of 56 accompanied by a deviation of 11 in cardiac electrical axis without functional changes in cardiac dynamics. The metabolic assessment, the scoliotic group compared with controls, had a significant change in glycogen reserves with greater intensity in the convexity, where the paraspinal muscles were more severely compromised, so did the total protein concentration. Regarding the density of the alveolar area, the scoliotic group showed lower values, something that not occurred on the amount of paraspinal muscle fibers. The profile of the phosphorylation enzymes of insulin signaling has followed the modifications of the profile of glycogen reserves and total protein. It is concluded that scoliosis is accompanied by metabolic and functional impairment in muscle homeostasis due to changes in enzyme profiles and the concomitant induction process triggered molecular curvature.

**Keywords:** scoliosis, rats, insulin, muscle, metabolism.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVO.....	21
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1 Parecer do Comitê de Ética.....	22
3.2 Desenvolvimento .....	22
3.3 Grupos Experimentais .....	22
3.4 Modelo Indutor de Escoliose .....	23
3.5 Aplicação do Dispositivo.....	24
3.6 Indução da Curvatura .....	25
3.7 Determinação do peso corporal, do dispositivo e dos alimentos .....	26
3.8 Estudo Radiográfico .....	27
3.9 Mensuração da angulação escoliótica.....	27
3.10 Análise eletrocardiográfica .....	28
3.11 Amostragem .....	29
3.12 Avaliação das proteínas fosforiladas (Western Blot).....	29
3.13 Glicogênio Muscular .....	31
3.14 Concentração de Proteínas Totais .....	31
3.15 Análise Histológica .....	32
3.16 Análise Estatística .....	34
4 RESULTADOS .....	35
4.1 Peso do Colete .....	35
4.2 Exames radiológicos .....	36
4.3 Controle de ingesta .....	37
4.4 Exame eletrocardiográfico .....	38
4.5 Glicogênio Muscular .....	39



4.6	Concentração de Proteínas Totais .....	40
4.7	Análise das Proteínas Fosforiladas .....	41
4.8	Análise Histológica .....	46
5	DISCUSSÃO .....	49
6	CONCLUSÃO .....	63
7	REFERÊNCIAS* .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

As alterações anatômicas da coluna vertebral têm sido investigadas em estudos clínicos e experimentais, especialmente com o objetivo de nortear a geração de novos protocolos de tratamento ou aprimorar os já existentes. Para tanto, se faz necessário o desenvolvimento de conhecimento científico capaz de fornecer subsídios que permitam a compreensão acerca da etiologia e das consequências que essas alterações podem provocar nos diferentes sistemas biológicos.

Escoliose é uma condição potencialmente progressiva, caracterizada pela deformidade da coluna vertebral, que sofre alteração em caráter tridimensional, com desvios no plano frontal, sagital e transversal, sendo que essas alterações podem se apresentar de forma bastante variável. Isso faz com que sejam necessários estudos em diferentes esferas, no intuito de auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no início, progressão, contensão e reversão da curvatura, além de ser base para tratamentos conservadores ou cirúrgicos (Ni et al., 2010).

Em sua forma de apresentação, a escoliose geralmente envolve a região torácica e/ou lombar, podendo apresentar-se em uma curva no formato de "S" ou em leve curvatura em "C" para na região toracolombar. Pode haver assimetria nos quadris, pelve e membros inferiores (Kisner e Colby, 2005).

Sabe-se que o principal critério de diagnóstico para escoliose, se dá por meio de exame radiológico, no qual deve ser observado se a coluna apresenta inclinação maior que  $10^\circ$  no plano frontal, quando medida pelo método de Cobb (Anand e Baron, 2011; Silva e Lenke, 2010). No que diz respeito à incidência e prevalência, trata-se de uma condição que acomete cerca de 3% da

população (criança/adolescente) mundial, sendo prevalente no gênero feminino (Trobisch, Suess e Schwab, 2010).

Em relação ao grau de angulação da curvatura escoliótica, curvas com até 20° são consideradas como leve, curvas entre 20° e 45°, são consideradas moderadas e curvas com mais de 45° são consideradas como escoliose grave, sendo passível de intervenção cirúrgica (Neira et al., 2011).

Segundo sua etiologia, a escoliose pode se apresentar por diferentes tipos, como a idiopática, a congênita e a degenerativa.

A escoliose idiopática é a forma mais comum de desvio lateral da coluna, sua prevalência é de aproximadamente 3% na população em geral (Lonstein, 1995). Geralmente, ocorre em crianças saudáveis e neurologicamente normais. Porém essa deformidade acarreta repercussões estéticas e psicossociais graves, além de alterações na função pulmonar e degeneração na coluna vertebral, sendo sua etiologia ainda desconhecida, mas indica ser multifatorial: fatores genéticos, de crescimento, bioquímicos, mecânicos e neuromusculares (Boachie-Adjei e Lonner, 1996; Lonstein, 1995).

Fatores que acarretam em uma rotação dos corpos vertebrais no sentido da convexidade que é melhor visualizada quando o paciente realiza flexão de tronco, produzindo uma gibosidade (Stokes, Armstrong e Moreland, 1988).

Na escoliose degenerativa sua deformidade, geralmente, tem início durante a vida adulta em decorrência de alterações que envolvam o disco intervertebral ou as articulações zigopofisárias, conduzindo a perda do equilíbrio biomecânico e sobrecarregando regiões assimétricas, local o qual as alterações se desenvolvem (Benner e Ehni, 1979).

A escoliose congênita é causada por modificações embriológicas no período de formação da coluna vertebral, sendo sua etiologia desconhecida, resultando em deformidades vertebrais e progressão da curvatura no plano frontal (Benacerraf, Greej e Barss, 1986).

A escoliose pode ser classificada como estrutural e não estrutural, sendo que a primeira pode ser hereditária na maioria dos casos, há presença de rotação das vertebrais sendo que ao indivíduo realizar a flexão de tronco, ocorrerá a gibosidade (Dimeglio, 1990).

A escoliose não estrutural é mais frequente em adolescentes, sendo que suas curvas são leves e desaparecem por completo com a flexão da coluna vertebral, não apresentando gibosidade. Geralmente é causada por diferença de longitude dos membros inferiores, levando a uma obliquidade pélvica, espasmos, dores musculares, compressão de raiz nervosa, traumatismos e maus hábitos posturais (Bonorino, Borin e Silva, 2008).

A população mundial classificada como adolescente está susceptível aos efeitos prejudiciais que a escoliose pode instalar. Dentre esses efeitos, destacam-se o comprometimento na homeostasia dos sistemas cardiovascular e respiratório, desequilíbrio na ação integrada entre os músculos do dorso, seguido de outras alterações orgânicas que tem merecido cada vez mais atenção por parte das políticas públicas de saúde, com a justificativa de se elucidar estratégias de tratamento conservador nos casos de escoliose (Zaborowska-Sapeta et al., 2011).

Os sinais e sintomas mais comuns em crianças e adolescentes são: dor nas costas, discrepância dos membros inferiores, deformação da superfície dorsal, seguida de transtornos psicológicos. Em adultos, além da deformidade na

superfície corpórea tem sido relatado dor nas costas, que interfere diretamente na qualidade de vida. Sabe-se ainda, que a progressão da deformação pode culminar em comprometimento cardiopulmonar, haja vista as relações anatômicas das estruturas envolvidas (Rowe et al., 2006; Liu et al., 2010; Neira et al., 2011).

Muito embora a maioria das escolioses sejam classificadas como idiopáticas, estudos atribuem três vertentes como fator causal: neuro-hormonal, genética e músculoesquelética (Zaborowska-Sapeta et al., 2011).

Nesse contexto, independentemente do fator causal, Shi et al. (2011) atestam que cerca de 48% de voluntários escolióticos que passaram por intervenção conservadora apresentaram contenção na progressão da curvatura, fato este que elucida a eficácia e significância do tratamento conservador, mesmo nos casos em que a etiologia não está bem definida.

Por se tratar de uma condição de caráter potencialmente progressiva, o diagnóstico precoce, ou seja, antes de ocorrer à rotação vertebral significativa poderá prevenir ou minimizar as complicações que se instalam com a progressão. Assim, são necessários estudos que viabilizem meios de intervir precocemente (Costa, Sousa e Oliveira, 2002).

Estudos ressaltam que a progressão da curvatura escoliótica, pode ocorrer de forma rápida e repentina, e assim pode predispor o indivíduo a uma condição altamente incapacitante; outro fator relevante apontado por esses estudos é a constatação de que se o diagnóstico e o tratamento forem realizados de forma precoce, os custos serão menores e poderá haver estabilização ou até mesmo reversão da curvatura escoliótica (Ferreira e Defino, 1999; Smith e Fernie, 1991).

Dentre os tratamentos disponíveis nos casos de escoliose, o ato cirúrgico pode ser uma experiência traumática, visto que tal procedimento ocorre na infância ou adolescência e pode interferir na qualidade de vida e nas atividades lúdicas da criança/adolescente. Assim, intervenções não invasivas devem ser exploradas e estudadas, uma vez que os resultados alcançados por essa modalidade podem ser satisfatórios (Rigo e Grivas, 2010; Aleissa et al., 2011).

Em razão do seu caráter progressivo, e especialmente por se desenvolver nas fases de crescimento, a escoliose tem chamado à atenção de diferentes grupos de pesquisa, tanto àqueles que atuam predominantemente no âmbito clínico, quanto aos que trabalham com modelos experimentais.

Arruda, Silva e Guirro (2008), destacaram que a escoliose tem sido alvo de estudo por cientistas, em diferentes aspectos de análise e em diferentes modelos experimentais. No entanto, todas as metodologias de indução de escoliose existentes na literatura apresentam caráter invasivo. Assim, observa-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 quimiometabólica.

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, animais como galinha, coelho e rato são mais indicados para investigar a condição escoliônica. A condição escoliônica 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 1 a 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).

Com a metodologia de indução da escoliose de uma maneira não invasiva, se torna possível realizar avaliações histológicas e metabólicas sem o comprometimento das estruturas associadas ao quadro patológico em animais, quando utilizado o modelo de Silva et al. (2012).

Entendendo que o tecido muscular é um tecido altamente adaptável a estímulos ou à falta deles, quaisquer alterações na dinâmica contrátil dos músculos motores primários e secundários da coluna vertebral, de forma direta, pode se refletir em alteração funcional, como as observadas nos casos de escoliose, onde se tem hipotonia, fraqueza muscular difusa e dor de intensidade variada (Mordeicai e Dabke, 2012; Flunk, 2006). Estudos que investigam a escoliose relatam que a restrição funcional da coluna impacta diretamente os músculos paravertebrais e respiratórios, uma vez que esses músculos estão intimamente ligados à funcionalidade dos movimentos do tronco. (Roso et al., 2003; Tangsrud et al., 2001; Posadzki e Ernst, 2011).

A caixa torácica está ligada de uma maneira íntima com os pulmões devido a estrutura anatômica das pleuras viscerais e parietais e por ligamentos que as ligam aos músculos intercostais e diafragma às costelas, de tal forma que o ciclo respiratório exige sincronismo entre a caixa torácica, pela articulação costovertebral e costotransversa, pulmões e pela musculatura postural e respiratória, os quais devem atuar de forma coordenada (Silva, 1991).



A complacência pulmonar sofre influencia da postura corporal, como resultado dos efeitos da gravidade sobre a mecânica respiratória (Feltrin e Jardim, 2004). A ventilação pulmonar está diretamente relacionada com as curvaturas da coluna vertebral ou com alterações da mobilidade torácica, como uma má formação ou escoliose. Entre essas alterações as adaptações antálgicas por dor se destacam (Costa, 2004).

Dessa maneira, é possível que o quadro de escoliose mude as estruturas anatômicas do pulmão, podendo comprometer a dinâmica respiratória, já que é necessário um trabalho conjunto entre as estruturas do tórax como as costelas, vértebras e músculos estabilizadores da coluna, sendo o músculo paravertebral o principal, junto com os componentes do sistema respiratório.

Para compreender o funcionamento das vias metabólicas glicolíticas e conseqüentemente o metabolismo da musculatura paravertebral, é necessário observar a sinalização insulínica da célula.

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , que atua como uma enzima alostérica. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (White, 1998; Saad, 1995).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Atualmente, já foram descritos inúmeros substratos do receptor de insulina, porém, merece destacar que quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS. Outros substratos

incluem Shc, Gab-1, p60<sup>dok</sup>, Cbl, JAK2 e APS. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3 quinase (PI 3-quinase). As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram recentemente estabelecidas através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (Carvalho et al., 2002b; Saad et al., 1995).

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que reduz a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina. Essas fosforilações inibitórias causam *feedback* negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina. A PI 3-quinase é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulada pela insulina. A PI-3 quinase foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios YMXM e YXXM (onde Y= tirosina, M= metionina e X= qualquer aminoácido) fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI 3-quinase ativa o domínio catalítico associado. A enzima catalisa fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Atualmente, a PI 3-quinase é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose. As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a AKT e as isoformas atípicas da aPKC, porém a

função destas proteínas no transporte de glicose ainda não está bem estabelecida (Carvalheira et al., 2002a).

Além da ativação da PI 3-quinase, outros sinais também são necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose. Essa segunda via envolve a fosforilação do protooncogene Cbl a associado com a proteína adaptadora CAP formando o complexo Cbl-CAP que ao migrar para a membrana celular interage com a proteína CrkII que fica associada com a proteína C3G que é uma proteína trocadora de nucleotídeos que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10 ativando-a. Uma vez ativada, TC10 causa um sinal para a translocação da proteína GLUT4, em paralelo à ativação da via da PI 3-quinase.

A insulina também estimula a *mitogen-activated protein* (MAP) quinase, que é uma via iniciada com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da SHP2. Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares. A insulina aumenta a síntese e bloqueia a degradação de proteínas através da ativação da mTOR. mTOR controla a translação de proteínas diretamente através da fosforilação da p70- ribossomal S6 quinase ( $p70^{\text{rsk}}$ ), que ativa a síntese ribossomal de proteínas através da fosforilação da proteína. A mTOR também fosforila a PHAS1, que aumenta a síntese proteica via aumento da translação de proteínas.

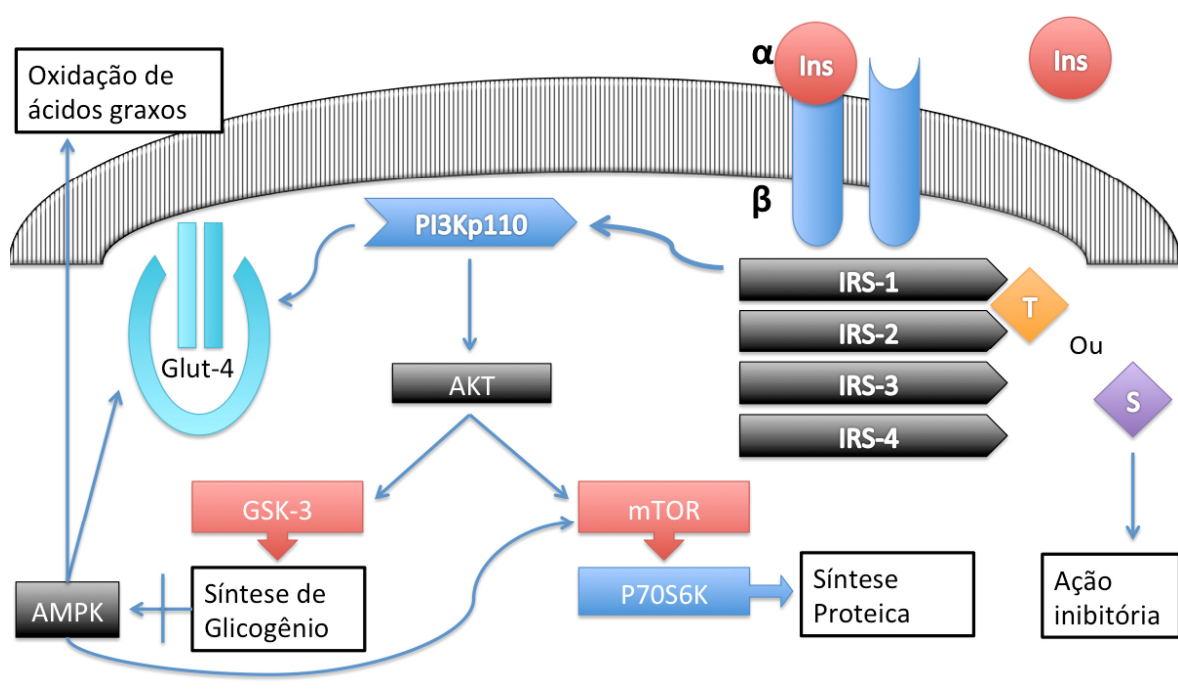


Figura 1 – Representação esquemática das vias intracelulares da sinalização insulínica. INS: Insulina, IRS: Substrato de receptor de insulina, T: Tirosina, S: Serina, PI3K: Fosfoinositol 3 quinase, AKT: Proteína Quinase B, GSK-3: Proteína quinase da glicogênio, mTOR: Alvo da rapamicina de mamíferos, P70S6K: Proteína quinase S6 ribossômica e AMPK: Proteína quinase ativada por AMP.

Não existe um consenso sobre o comportamento das vias metabólicas ao se tratar de escoliose, sendo que esse dado poderia nortear a geração de protocolos segmentados na melhora das vias sinalizadoras insulínicas. Aventa-se a possibilidade de modificações significativas no aspecto estrutural da coluna vertebral, bem como na sua funcionalidade podem estar acompanhadas de desajustes nas vias de controle metabólico da musculatura esquelética que sustenta e organiza as ações inerentes a coluna.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivos gerais**

Este estudo visa analisar o perfil das vias de sinalização intracelular insulínica na porção côncava e convexa da musculatura paravertebral de ratos escolióticos e ainda, buscar informações sobre o perfil histológico da densidade alveolar e comparar o eletrocardiograma de ratos normais com ratos induzidos à escoliose.

### **2.2 Objetivos específicos**

Dentro dos objetivos específicos foram avaliados os seguintes parâmetros: a) reservas glicogênicas dos músculos paravertebrais, b) concentração de proteína total dos músculos paravertebrais, c) avaliação da fosforilação das enzimas AKT, mTOR; p70S6k e AMPK nos músculos paravertebrais do lado côncavo e convexo, d) densidade alveolar dos pulmões do lado côncavo e convexo, e) Área de secção transversa da fibra muscular do músculo paravertebral do lado côncavo e convexo e f) perfil elétrico cardíaco através do eletrocardiograma.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Parecer do Comitê de Ética

O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), sob protocolo nº 07/2012.

#### 3.2 Desenvolvimento

O estudo se divide em três fases assim definidas: Primeiramente foi realizada a indução da curvatura escoliótica (aproximadamente 3 meses). No segundo momento, foi realizado o eletrocardiograma e a radiografia dos animais e, no terceiro momento, foram feitas avaliações histológicas do tecido pulmonar e dos músculos paravertebrais, análises de glicogênio, da proteína total e biomoleculares, como demonstra na figura 2.

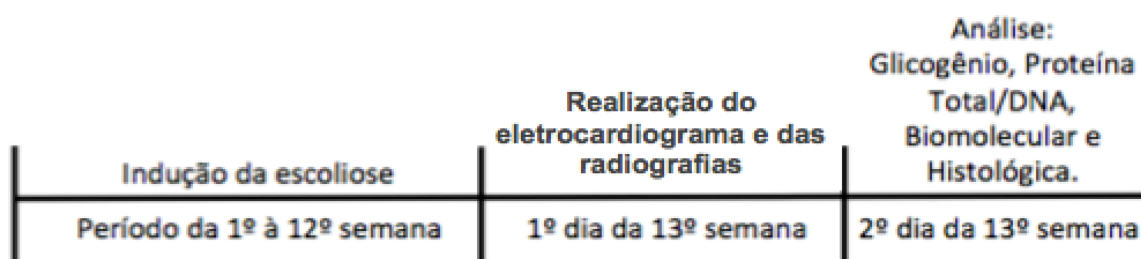


Figura 2 – Representação esquemática do período experimental.

#### 3.3 Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos machos albinos *Wistar* (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*) com 42 dias de idade adquiridos da empresa ANILAB® - Paulínia, SP. Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas coletivas contendo 4 animais em cada, recebendo água e alimentação *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 °C ± 2 °C e iluminação adequada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6

horas. Os cuidados experimentais seguiram recomendações do *Guide for Care Use of Laboratory Animals National Research Council*, (1996).

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais, com n=10, denominados controle (CON) e escolióticos (ESC), que passaram pelo processo de indução da curvatura escoliótica.

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

Placas de policloreto de vinil (PVC) com espessura de 0,50 mm foram utilizadas para a montagem dos modelos, visto que esse material confere grande flexibilidade ao dispositivo indutor de escoliose, além de facilitar o ajuste ao corpo do animal e ser leve.

O dispositivo indutor de escoliose foi desenhado, recortado, perfurado com caneta de baixa rotação acoplada a um sistema de desgaste e encapado com fita isolante da marca 3M®, no intuito de minimizar o atrito do dispositivo com o corpo do animal.

Com base na morfologia do animal, a parte anterior do dispositivo foi menor tanto no tamanho, quanto na circunferência de passagem dos membros. Por outro lado, a parte posterior teve as circunferências maiores e contou com pequenos orifícios centrais, cuja finalidade foi favorecer a drenagem de urina e evitar irritação cutânea (figura 3 A e B).

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 3 C e D).



Figura 3 - Dispositivo anterior e posterior (A), ajuste ao corpo do animal (B), sistema de cinta regulável (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, no intuito de induzir a curvatura escoliótica à direita (figura 4 A e B).



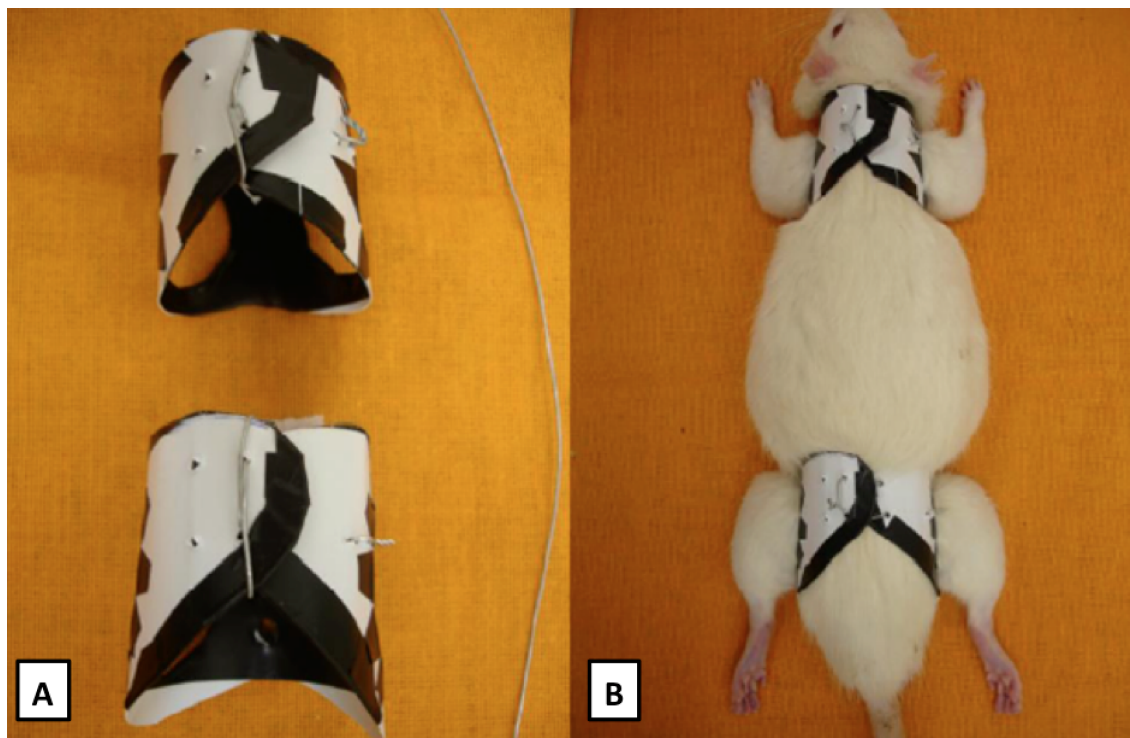


Figura 4 - Parte anterior e posterior do dispositivo fechado em sistema de cinta regulável (A), com destaque para o lado direito, que conta com o anulo de arame para a passagem da haste que induz a curvatura, após o dispositivo estar ajustado ao corpo do animal (B).

### 3.6 Indução da Curvatura

Os animais receberam o dispositivo indutor de escoliose, na fase pós desmame (42 dias), sendo realizada uma inclinação da coluna de aproximadamente  $55^\circ$  para o lado direito, de modo a induzir uma escoliose sinistro convexa ou em “C” à esquerda (figura 5: 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. O dispositivo foi trocado a cada 07 dias, por um novo e maior, de acordo com o crescimento do animal, sendo mantido até a 12<sup>a</sup> semana de experimento. Todo o protocolo de indução da curvatura escoliótica seguiu os parâmetros de Silva et al. (2012).

Na figura 5 C pode-se observar o animal com o dispositivo adaptado ao corpo, durante atividade de deambulação.

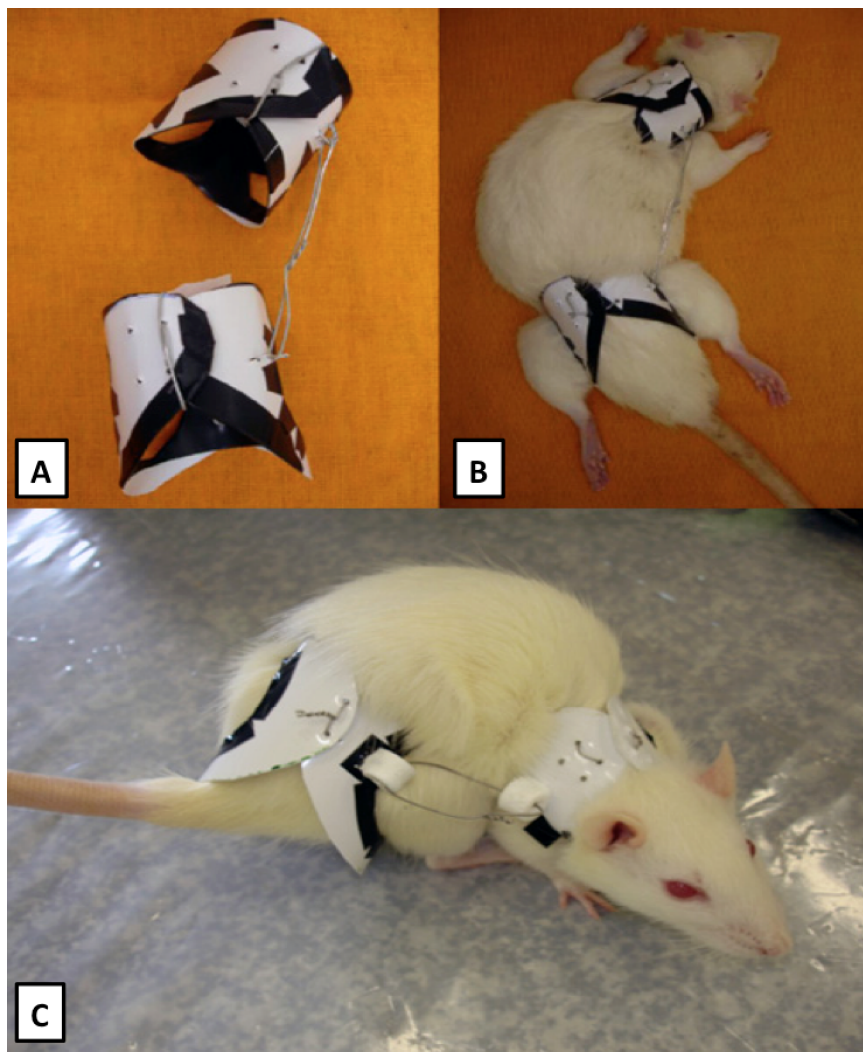


Figura 5 - Dispositivo indutor pronto (A) e adaptado ao corpo do animal (B), seguido da condição de deambulação (C).

### 3.7 Determinação do peso corporal, do dispositivo e dos alimentos

Semanalmente, os dispositivos e os animais foram pesados, 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>.

A ração e a água foram pesadas antes e depois da alimentação dos animais para realizar a verificação da quantidade de ingesta alimentar.

### **3.8 Estudo Radiográfico**

A avaliação radiográfica foi realizada na clínica de Radiologia da Faculdade de Odontologia da UNICAMP (FOP-PIRACICABA) sob orientação do Prof. Dr. Francisco Haiter Neto. Os parâmetros para obtenção das radiografias e sequente análise radiológica foram distância foco-chassi 75cm, intensidade 50Kvp e 6 impulsos de tempo de exposição.

Os grupos experimentais foram submetidos a exposição ao exame, sendo que ele ocorreu na 12<sup>a</sup> semana (imediatamente após a retirada do dispositivo). Convém ressaltar que para a realização dos exames, os animais foram sedados com Ketamina-Xilazina (35 mg/kg peso e 4 mg/kg peso) via intramuscular.

### **3.9 Mensuração da angulação escoliótica**

Para obtenção da angulação da curvatura escoliótica, os exames radiológicos foram digitalizados e submetidos à análise no software ALCIMAGEM 2003. Assim, o vértice da curvatura foi o primeiro ponto a ser marcado (A1), de modo que a partir desse ponto, duas retas foram traçadas no sentido cranial (A2) e caudal (A3). No lado côncavo da curvatura é que se obteve a angulação escoliótica, de modo que o valor foi obtido a partir da subtração de um ângulo de 180°, conforme figura 6.

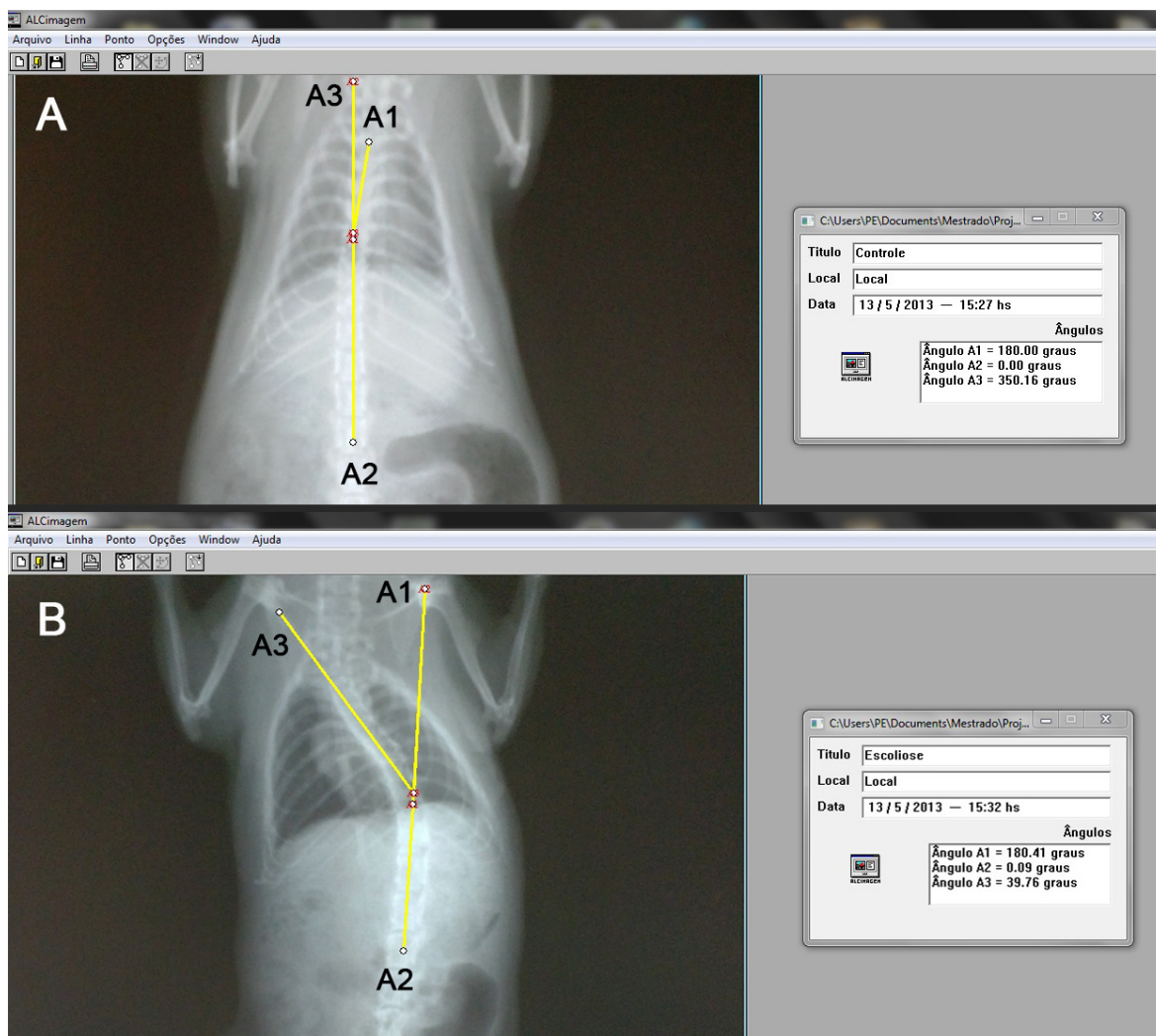


Figura 6 – Obtenção dos dados referente à angulação da curvatura escoliótica pelo software ALCIMAGEM 2003, mostrando o grupo controle (A) e o grupo escoliótico (B).

### 3.10 Análise eletrocardiográfica

Para a avaliação das ondas e intervalos eletrocardiográficos, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) via intraperitoneal baseado em estudos nos quais foram demonstrados que os barbitúricos não alteram o perfil elétrico cardiovascular (Kumar, 1995), mantidos em posição supina, com respiração espontânea durante o registro do ECG (Figura 7). Os eletrodos foram conectados aos canais do computador (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações

amplificadas (aVR, aVL e aVF), com sensibilidade N e velocidade de 50 mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isoeletrica definido como segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ( $QTc = QT / \sqrt{RR}$ ). As análises foram feitas por um único avaliador para minimizar as divergências na medida da dispersão.

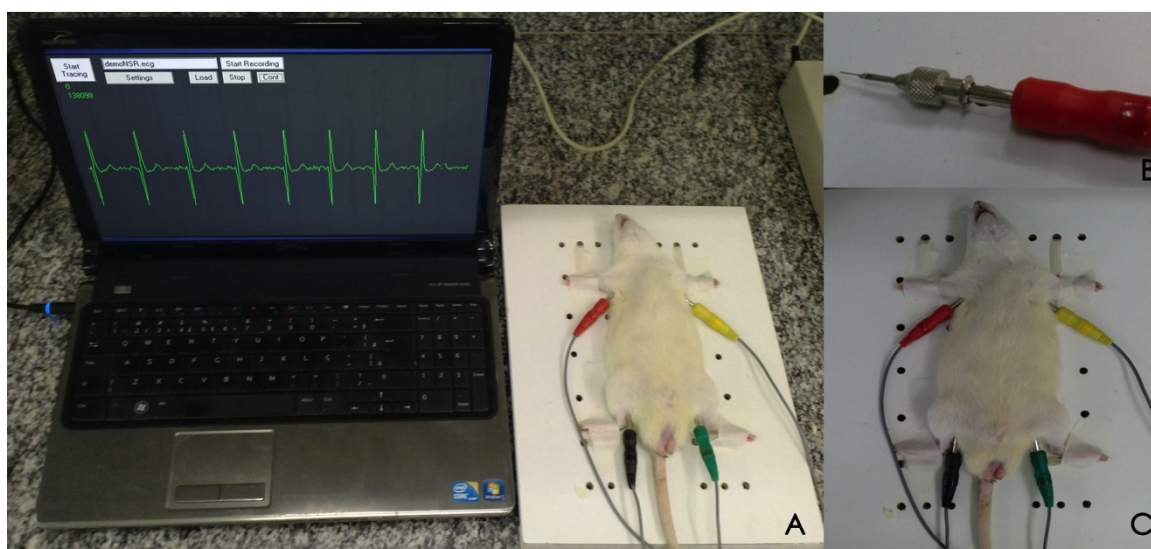


Figura 7 - Sistema de obtenção do registro eletrocardiográfico. A) Aparelhagem utilizada para a realização do registro (Heart Ware System); B) Eletrodo com agulha acoplada; C) Posicionamento dos eletrodos no corpo do animal

### 3.11 Amostragem

Para coleta das amostras, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg) via intraperitoneal, sendo que as alíquotas dos músculos paravertebrais coletadas de ambos os lados e prontamente encaminhadas para avaliação bioquímica e histológica.

### 3.12 Avaliação das proteínas fosforiladas (Western Blot)

Os animais foram anestesiados pentobarbital sódico (40 mg/Kg), e em seguida decapitados, amostras do músculo, ambos os lados, foram rapidamente retiradas, lavadas em solução salina e alocadas em tampão de extração. O

material extraído foi submetido à 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 utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método fotocolorimétrico de Biureto, enquanto que a outra parte foi submetida ao Western Blot.

Os reagentes para determinação das proteínas totais (Biureto), SDS/PAGE e Western Blot foram obtidos da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). As membranas de nitrocelulose foram obtidas da Amersham Corp. (Aylesbury, UK). 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. 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 (5 % BSA dissolvido em solução basal). A membrana de

nitrocelulose foi incubada, *overnight*, com anticorpos específicos (anti-pSer473) AKT (#4058), anti-pAMPK (#2537), anti-pmTOR (#2971), os quais foram obtidos da empresa Cell Signaling Technology (Beverly, MA), diluídos em solução para anticorpo (3 % BSA dissolvido em solução basal), e então, lavada por 15 minutos com solução basal (150 mM NaCl, 10 mM Trisma base e 0.02 % Tween 20). A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por quimioluminescência, utilizando-se *kit* comercial da Amersham e seguindo as orientações do fabricante. Para controle interno da amostra foi utilizado a  $\beta$ -Actina. Após a revelação das auto-radiografias, as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica.

### **3.13 Glicogênio Muscular**

Amostras do músculo paravertebral foram coletadas e submetidas à 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**

Foi utilizado o Kit PROTAL da Laborlab<sup>®</sup>, com os valores sendo expressos em mg/100mg.

### 3.15 Análise Histológica

#### 3.15.1 Músculo Paravertebral

O músculo paravertebral foi retirado e fixado em suporte de madeira com tragacanth gum, imerso em isopentano à -80°C por 40 segundos e imediatamente foi colocado em nitrogênio líquido à -159°C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70°C.

Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23°C, seccionados transversalmente, com espessura de aproximadamente 10 µm, utilizando criostato e foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Para cada animal, foram selecionados 5 cortes e em cada um deles foram captadas aleatoriamente, imagens de 5 áreas, utilizando o *software* Image Pró-plus 6.2 (Media Cybernects®) e uma câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com uma objetiva 10x, sendo que o *software* permitiu visualizar as imagens em uma área da tela (área de flame) de 190.464,12 µm<sup>2</sup>. Para a análise da secção transversa das fibras foram analisadas 15 fibras por área em cada corte, totalizando 375 fibras por animal, de forma aleatória, segundo técnica morfométrica de Mandarin de Lacerda et al. (2010).

#### 3.15.2 Pulmão

Análise da área alveolar, foi procedida por fixação em solução tamponada de formol a 10%, fragmentos do parênquima pulmonar passaram por desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em paraplast.

Cortes não seriados de 6 µm de espessura foram obtidos e após desparafinização em xilol e hidratação em soluções decrescentes em álcool e



água, foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrosirius em uma concentração de 1% (Sirius red em solução saturada de ácido Pícrico), e montados em lâminas permanentes com Entellan®, as lâminas foram cegadas antes das análises.

Em seguida, as imagens do pulmão foram captadas por uma câmera Olympus BX41 acoplada a um microscópio (Olympus U-KPA), integrado a um microcomputador, dotado do software Image Pró-plus 6.2 (Media Cybernects®).

Para avaliação da densidade de área da porção do parênquima pulmonar, foram obtidas imagens somente da parte aérea, alvéolos, sacos alveolares e ductos alveolares, excluindo-se os brônquios, bronquíolos e grandes vasos sanguíneos.

Foram selecionados cinco fragmentos de pulmão por animal, 5 cortes por fragmentos, 5 áreas por corte. Totalizando 125 imagens por animal. A densidade de área alveolar foi obtida por meio de planimetria por contagem de pontos segundo Mathueu et al. (1981) e Mandarin de Lacerda et al. (2010).

Os dados em porcentagem foram calculados da seguinte forma:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de intersecções sobre área alveolar}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de intersecções de retas}} \times 100$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ total de intersecções de retas} = 88$$

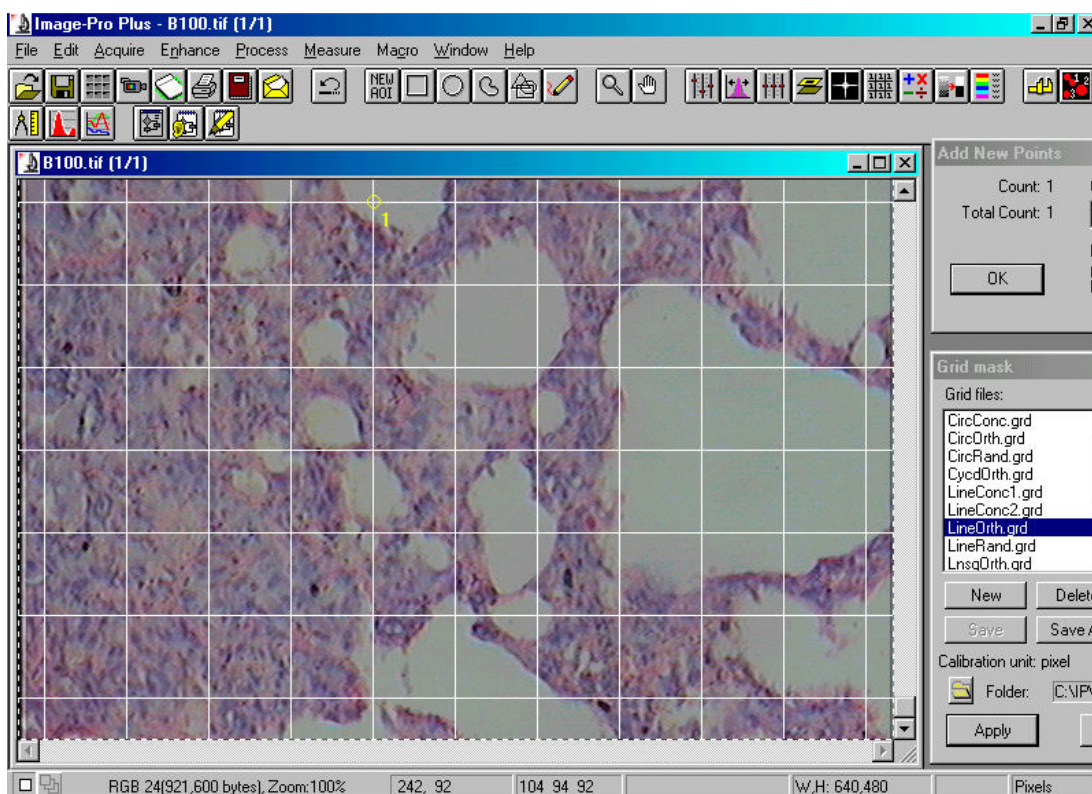


Figura 8 - Grade aplicada sobre a imagem do tecido pulmonar no *Software Image Pro-plus* 4.0, para a realização da planimetria. Os pontos de intersecção das retas coincidentes sobre a área alveolar foram contados

### 3.16 Análise Estatística

Os dados coletados foram tabulados e posteriormente analisados pelo *software* estatístico “Graphpad Prism 6”. A análise estatística foi procedida pela aplicação do teste Shapiro-Wilk para verificação da normalidade.

Os dados de peso do dispositivo indutor de escoliose e do eletrocardiograma, foram considerados paramétricos, assim houve análise de variância (ANOVA), seguido de Tukey-Kramer, enquanto os demais dados passaram pela avaliação da análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguido do teste de Sidak. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5%.

## 4 RESULTADOS

O peso corporal dos grupos experimentais foram avaliados durante as 12 semanas de experimentação sendo observado que o grupo escoliótico, ao final do experimento apresentou em média peso 18% menor se comparado ao grupo controle (figura 9).

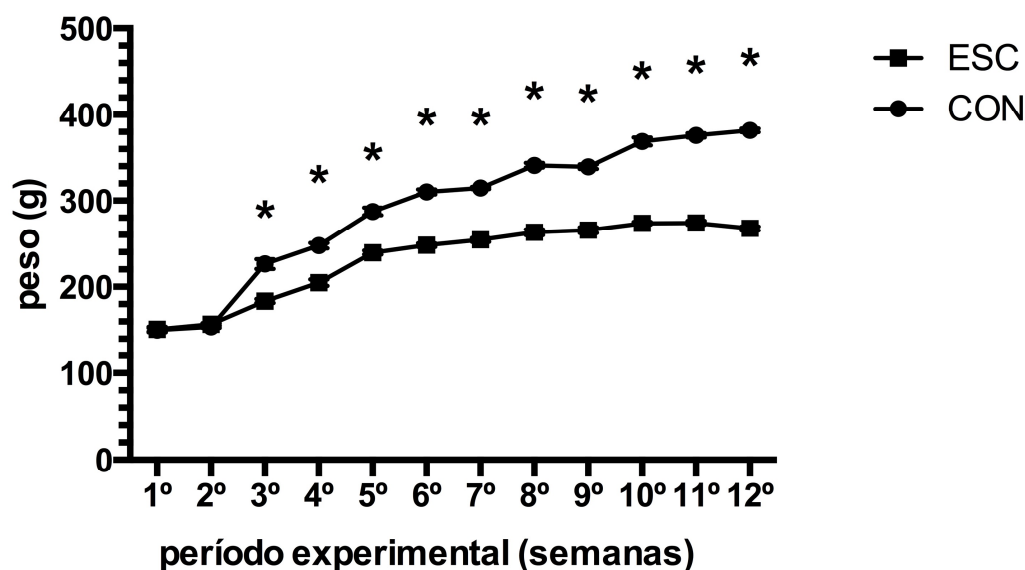


Figura 9 - Massa corporal dos animais em gramas (g), referente aos grupos controle e escoliótico, representados o período experimental da 1ª até a 12ª semana. Os valores são expressos em média  $\pm$  epm, n=10. \*p < 0,05 se comparado ao escoliótico.

### 4.1 Peso do Colete

Durante 12 semanas de indução de escoliose, o peso do dispositivo foi avaliado no intuito de buscar informações sobre uma possível interferência no procedimento de indução da curvatura e mostrou-se em média  $4,3 \pm 0,2\%$  do peso do animal, conforme mostra a figura 10.

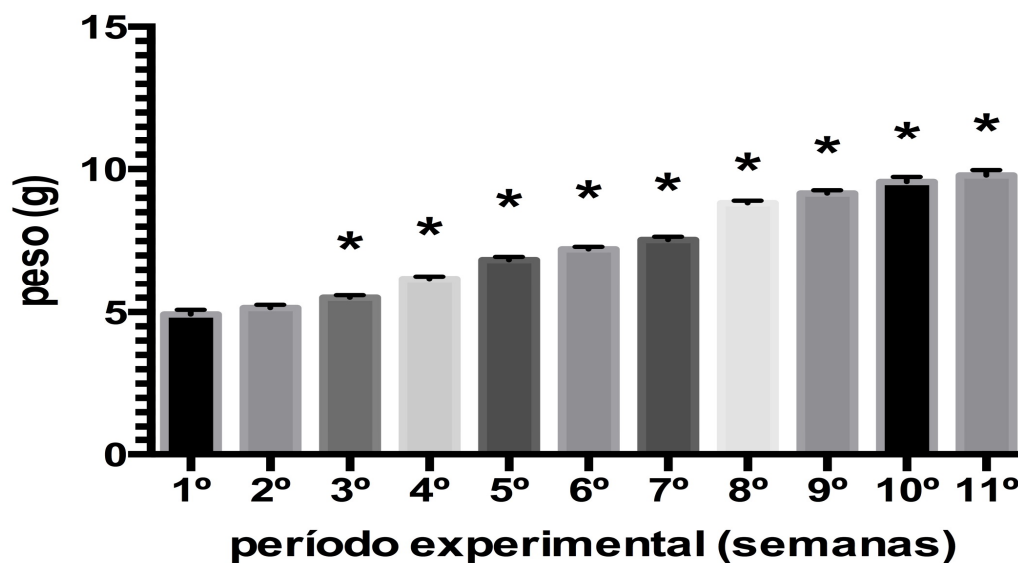


Figura 10 - peso médio em gramas (g) dos dispositivos (D) utilizados durante a indução da curvatura escoliótica, da 1ª à 12ª semana. \*p < 0,05 se comparado à semana anterior.

#### 4.2 Exames radiológicos

A análise radiográfica mostrou que no processo de indução da escoliose foi constatada angulação de  $55^\circ \pm 2$  na 12ª semana de estudo comparada ao controle  $1.2^\circ \pm 1$  indicando valores 4583% maiores.

Foi observado que o grupo submetido ao desenvolvimento da escoliose no período de 12 semanas apresentou severidade na angulação da curvatura comparado ao controle, como mostra a figura 11.

Observando a radiografia, foi feito círculos ao redor dos processos espinhos com o intuito de verificar rotação das vertebrae, algo visto nos animais submetidos à escoliose (figura 11).

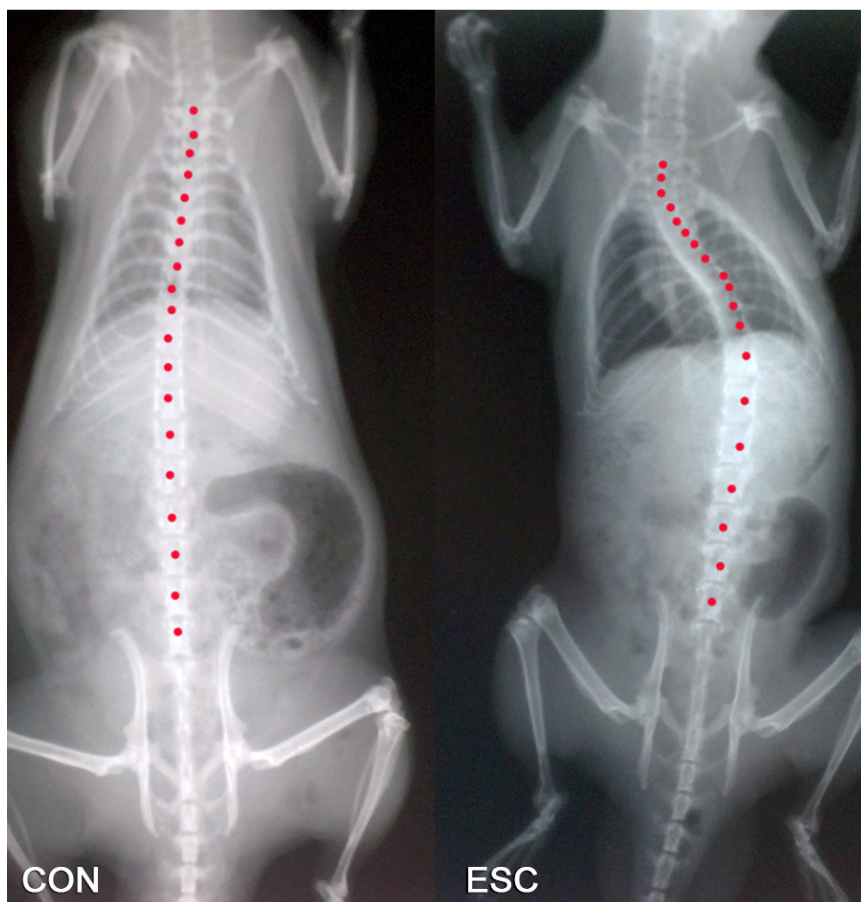


Figura 11 – Exames radiográficos com marcação dos processos espinhosos nos grupos experimentais, sendo controle (CON) e escoliótico (ESC), na 12ª semana do estudo para demonstrar as rotações vertebrais.

### 4.3 Controle de ingesta

Tendo em vista as alterações no peso dos animais foi avaliado o índice de ingesta e não foi observado diferença no consumo líquido (água) ou sólido (ração) no grupo escoliótico se comparados ao grupo controle, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Controle da ingesta sólida (g) e líquida (mL) dos grupos controle (CON) e escoliótico, durante as 12ª semana de estudo (ESC). Os valores estão expressos em média  $\pm$  epm.

Ingesta	CON	ESC
Água (mL)	35.3 $\pm$ 4.2	30 $\pm$ 3.3
Ração (g)	68.4 $\pm$ 3.4	64.2 $\pm$ 2.5

#### 4.4 Exame eletrocardiográfico

A avaliação eletrocardiográfica (ECG) foi realizada na 12<sup>a</sup> semana de estudo, condição na qual os animais apresentavam-se depois da última semana de indução da curvatura escoliótica. Nesta avaliação foi verificado que a frequência cardíaca (bpm) não apresentou diferença significativa entre os grupos sendo de  $151 \pm 30$  bpm no controle e  $169 \pm 22$  bpm no escoliótico.

Dentro do perfil de análise cardíaca, determinou-se o eixo elétrico ventricular por meio do SÂQRS, onde foi verificado a angulação de  $88^\circ \pm 3$  no controle (CON) e  $99^\circ \pm 2^\circ$  no escoliótico (ESC), o que indica um desvio de  $11^\circ$  ( $p < 0,05$ ) em decorrência da escoliose (figura 12).

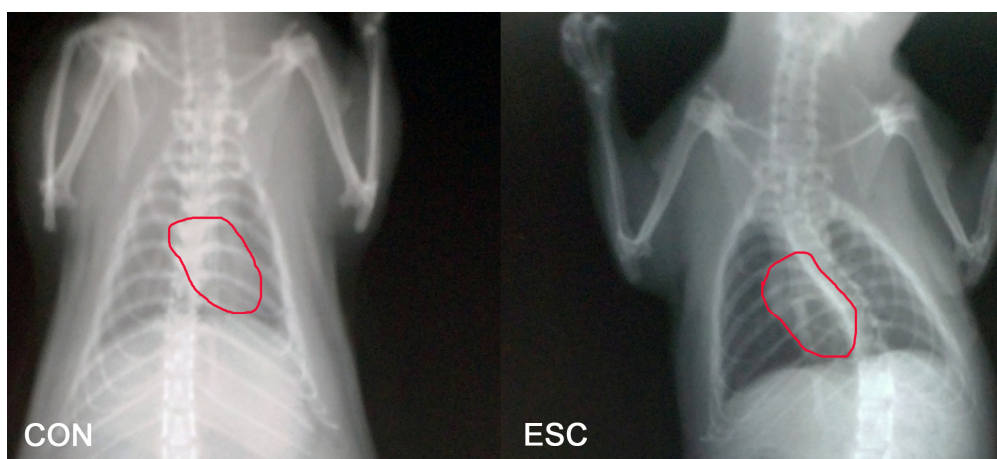


Figura 12 - Posição anatômica do coração no grupo controle (A) e escoliótico (B). A seta representa o eixo médio do coração.

Ao analisar outros parâmetros eletrocardiográficos, constatou-se que não houve diferença entre os grupos na duração da onda R ou no intervalo PR. Assim, a duração foi representada por  $34 \pm 7,5$  ms no grupo controle e  $29,2 \pm 2,0$  ms no escoliótico. No que diz respeito ao intervalo PR, obteve-se os valores de  $42 \pm 3,0$  ms no grupo controle e  $45 \pm 4,0$  ms no escoliótico.

Em relação ao tempo do intervalo QRS (ms), nota-se que o grupo controle apresentou  $59 \pm 7,4$  ms, enquanto que o grupo escoliótico apresentou valor de  $69 \pm 1.1$  ms, sendo que este padrão não apresentou alteração. O mesmo perfil foi observado ao se avaliar o intervalo QTc (a partir da correção pela fórmula de Bazett), que apresentou  $203 \pm 6.5$  ms no grupo controle e  $216 \pm 5,5$  ms no grupo escoliótico.

#### **4.5 Glicogênio Muscular**

Tendo como base a concavidade (direita) e convexidade (esquerda) da curvatura escoliótica foram analisadas as reservas glicogênicas dos músculos paravertebral (PV) direito (D) e esquerdo (E). No grupo controle, os músculos PVD e PVE não diferiram, por outro lado, os músculos do grupo escoliótico apresentaram reservas menores se comparados ao controle atingindo valores 17% e 22% respectivamente no PVD e PVE, conforme figura 13.

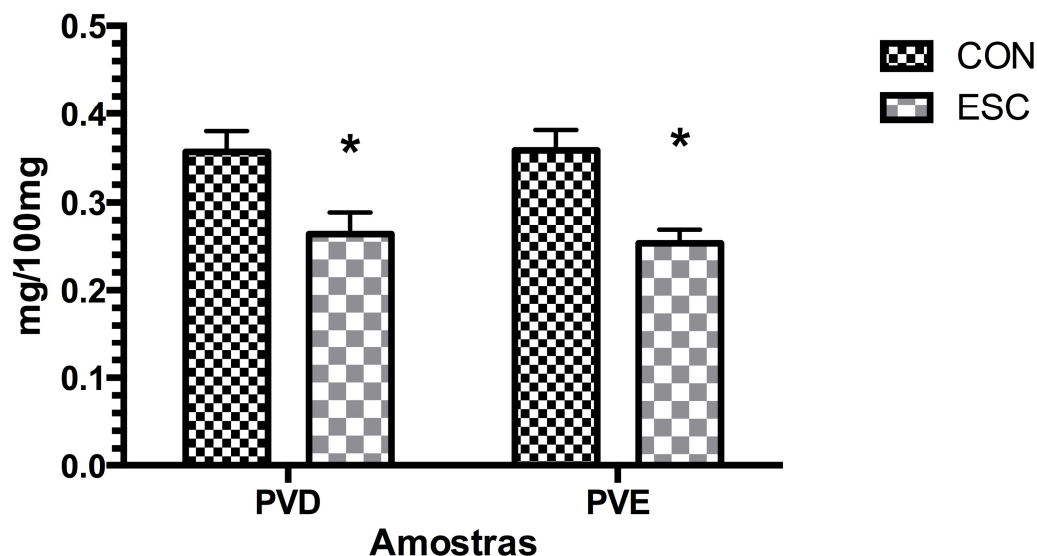


Figura 13 - Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos; paravertebral (PV), direito (D) e esquerdo (E) dos grupos controle (CON) e escoliótico (ESC). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=10. \*p<0,05 comparado ao CON ipsilateral.

#### 4.6 Concentração de Proteínas Totais

Na avaliação da concentração de proteínas totais dos músculos paravertebrais, observou-se que o grupo escoliótico apresentou valores em média 11% e 13% menores se comparado ao controle, do lado direito e esquerdo respectivamente, além de uma diferença significativa na comparação intragrupo dos animais escolióticos.



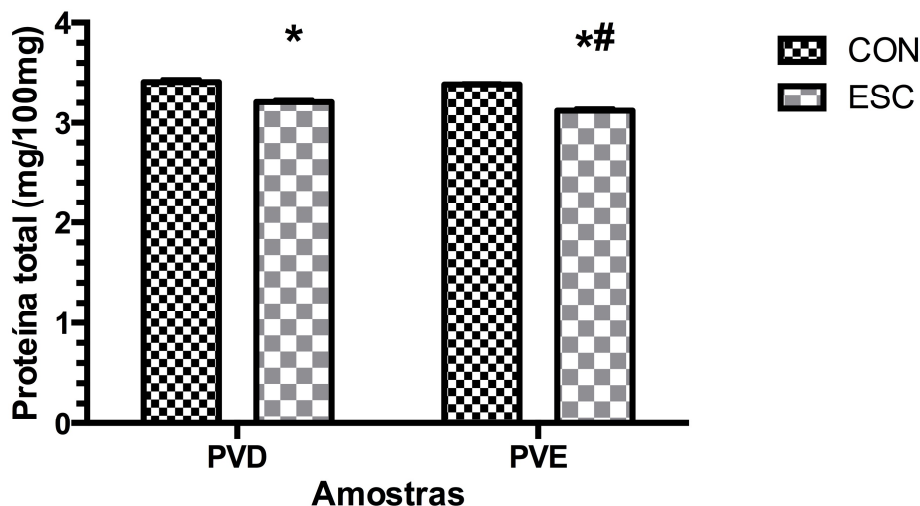


Figura 14 - Concentração muscular de proteína total (mg/100mg) dos grupos controle (CON) e escoliótico (ESC), sendo do lado convexo (esquerdo, E) e côncavo (direito, D). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=6. \*p < 0,05 comparado ao CON ipsilateral e #p < 0,05 comparado ao ESC contralateral.

#### 4.7 Análise das Proteínas Fosforiladas

Tendo em vista que o músculo esquelético responde a estímulos fisiológicos remodelando-se para se adaptar as demandas impostas pelo estímulo, é consenso na literatura que estímulos extracelulares que chegam à membrana celular interagem com receptores ativando vias de sinalização intracelular, as quais resultam em alterações na transcrição gênica e síntese proteica e conseqüentemente promovem o remodelamento da musculatura.

Observando o perfil enzimático foi avaliado a fosforilação da subunidade do receptor de insulina IR sendo observado que houve fosforilação 27% maior na fosforilação da IRS1 do músculo paravertebral convexo (esquerdo) do grupo escoliótico em relação ao lado direito do mesmo grupo. O grupo controle apresentou um aumento de 34,96% e 7,70% maiores em relação ao grupo escoliótico do lado direito e esquerdo, respectivamente. (figura 15).

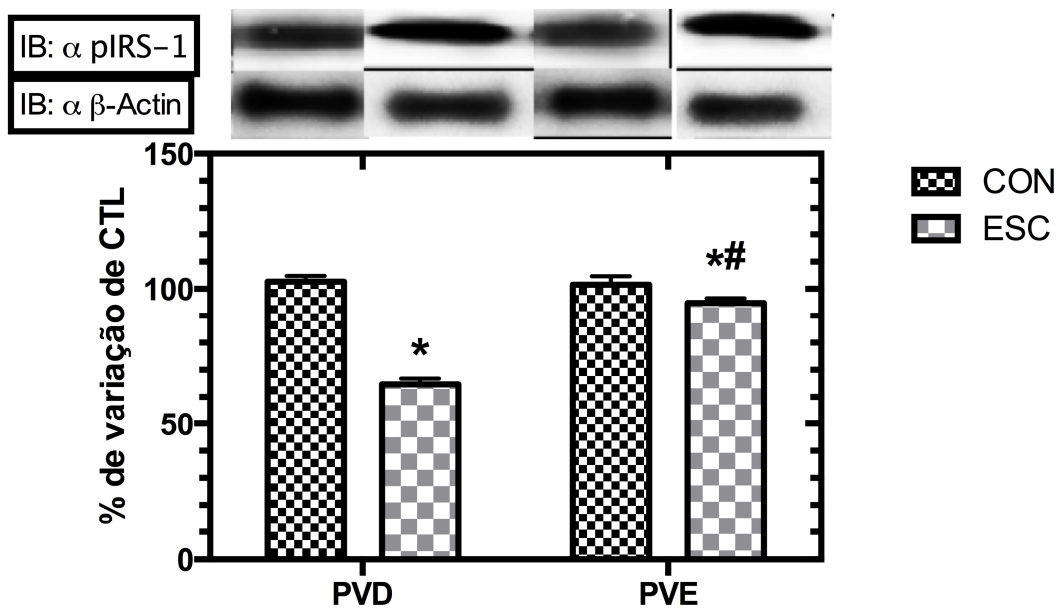


Figura 15 - Porcentagem de fosforilação da enzima IRS1 no músculo paravertebral (PV) do lado convexo (esquerdo, E) e côncavo (direito D) dos grupos controle (CON) e escoliótico (ESC). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm,  $n=3$ . \* $p < 0,05$  comparado ao CON ipsilateral e # $p < 0,05$  comparado ao ESC contralateral.

Para avaliar o comportamento das vias sinalizadoras da insulina, hormônio responsável tanto pelo equilíbrio da homeostase metabólica quanto pelo controle da interface anabolismo/catabolismo, continuou-se avaliando o comportamento da enzima AKT e foi observado que a fosforilação da enzima apresentou-se 73% maior no músculo paravertebral esquerdo em relação ao músculo paravertebral direito do grupo escoliótico e dos músculos do grupo controle ( figura 16).

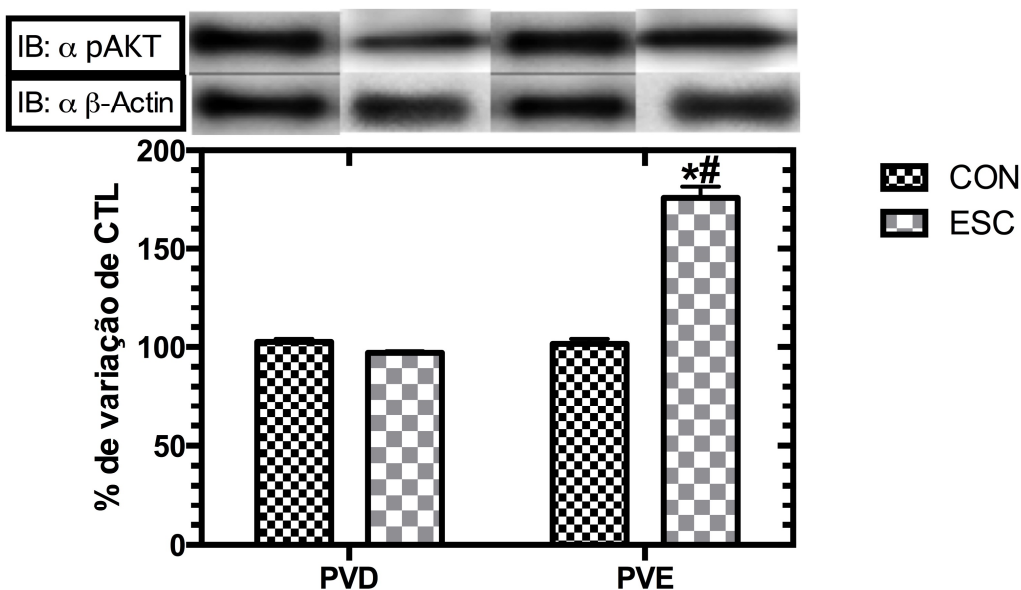


Figura 16 - Porcentagem de fosforilação da enzima AKT no músculo paravertebral (PV) do lado convexo (esquerdo, E) e côncavo (direito, D) dos grupos controle (CON) e escoliótico (ESC). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm,  $n=3$ . \* $p < 0,05$  comparado ao CON ipsilateral e # $p < 0,05$  comparado ao ESC contralateral

Acompanhando a atividade das enzimas, passou-se a avaliar a fosforilação da enzima AMPK sendo observado que no músculo paravertebral esquerdo do grupo escoliótico, a fosforilação da enzima foi 33,03% menor se comparado ao paravertebral direito do mesmo grupo, no entanto o grupo controle demonstrou atividade de fosforilação da enzima 27,36% e 59,63% maiores em relação ao lado direito e esquerdo do grupo escoliótico, como mostra a figura 17.

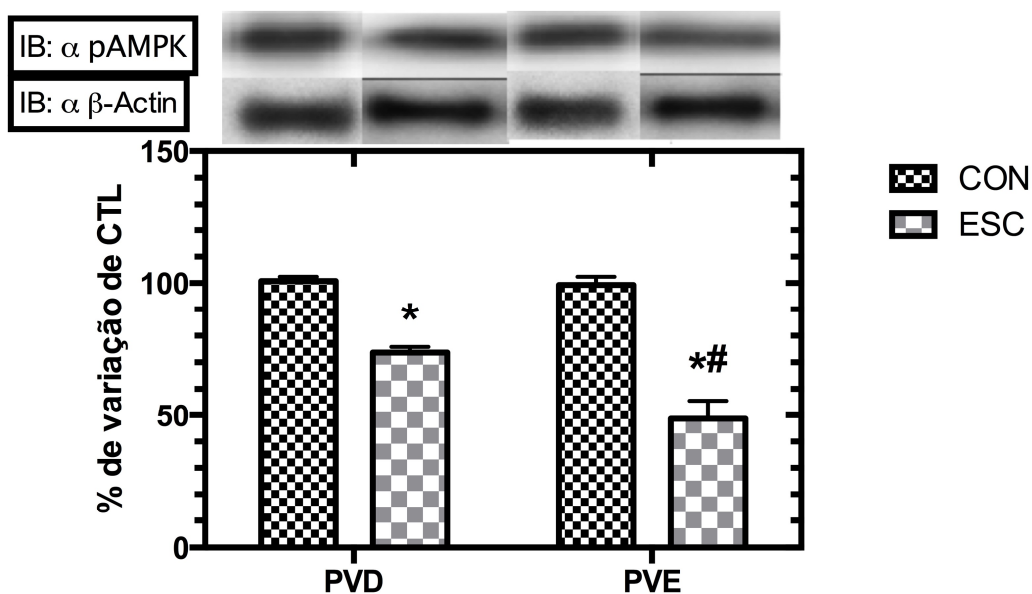


Figura 17 - Porcentagem de fosforilação da enzima AMPK no músculo paravertebral (PV) do lado convexo (esquerdo, E) e côncavo (direito D) dos grupos controle (CON) e escoliótico (ESC). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm,  $n=3$ . \* $p < 0,05$  comparado ao CON ipsilateral e # $p < 0,05$  comparado ao ESC contralateral.

Baseado na integração entre os sistemas homeostáticos passou-se a avaliar a porcentagem de fosforilação da enzima mTOR (proteína alvo/sensível a rapamicina) sendo observado redução de 25,43% na fosforilação da enzima no músculo paravertebral direito comparado com o esquerdo do grupo escoliótico e 26,66% se comparado ipsilateralmente em relação ao grupo controle, como mostra a figura 18. Neste mesmo perfil de análise foi avaliado a fosforilação da enzima p70S6K sendo observado que no lado convexo (esquerdo) do grupo escoliótico a fosforilação foi 8% maior se comparado ao lado côncavo (direito) do mesmo grupo. O grupo controle apresentou valores superiores em relação ao grupo escoliótico em 59,97% e 40,01% do lado direito e esquerdo, respectivamente, acompanhando o comportamento da enzima mTOR, uma vez

que, a mTOR funciona como sensor da disponibilidade de nutrientes e também atua no crescimento celular junto com p70s6k (figura 19).

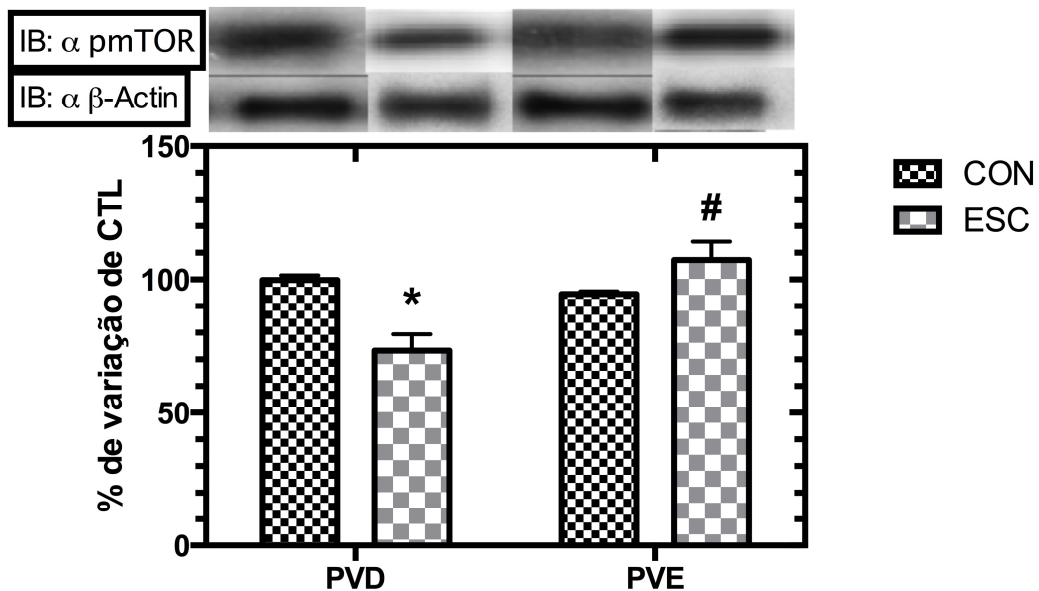


Figura 18 - Porcentagem de fosforilação da enzima mTOR no músculo paravertebral (PV) do lado convexo (esquerdo, E) e côncavo (direito D) dos grupos controle (CON) e escoliótico (ESC). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=3. \*p < 0,05 comparado ao CON ipsilateral e #p < 0,05 comparado ao ESC contralateral.

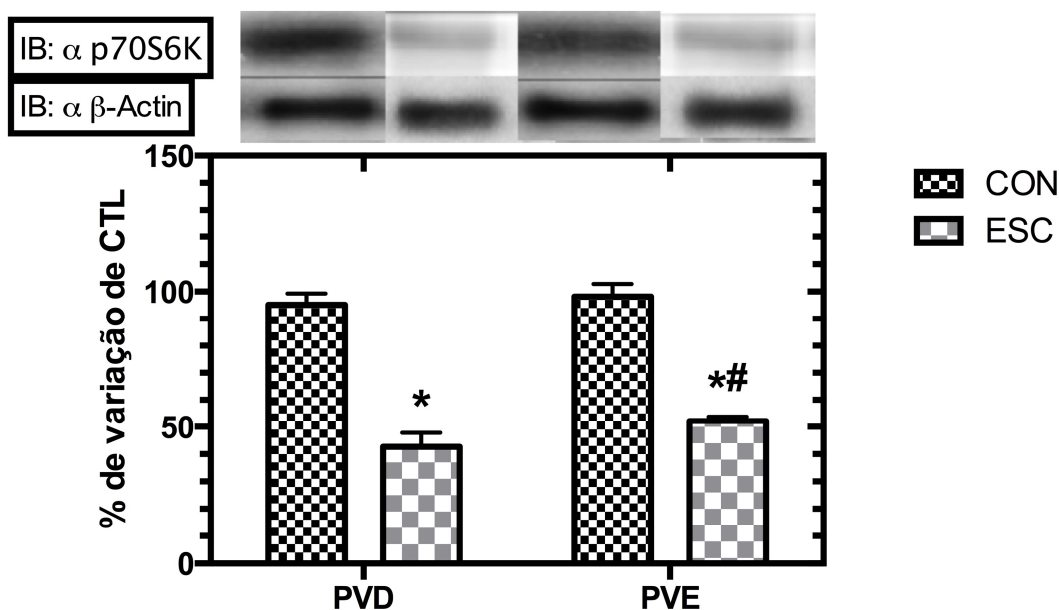


Figura 19 - Porcentagem de fosforilação da enzima p70S6K no músculo paravertebral (PV) do lado convexo (esquerdo, E) e côncavo (direito D) dos grupos controle (CON) e escoliótico (ESC). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm,  $n=3$ . \* $p < 0,05$  comparado ao CON ipsilateral e # $p < 0,05$  comparado ao ESC contralateral.

#### 4.8 Análise Histológica

Com intuito de verificar a anatomia pulmonar dos ratos induzidos à escoliose, foi analisado a planimetria do pulmão, observando a densidade de área alveolar, a qual se mostrou superior no grupo controle com valores 39,47% e 44,38% em relação ao grupo escoliótico nos pulmões direito e esquerdo, respectivamente, como visto na figura 20.

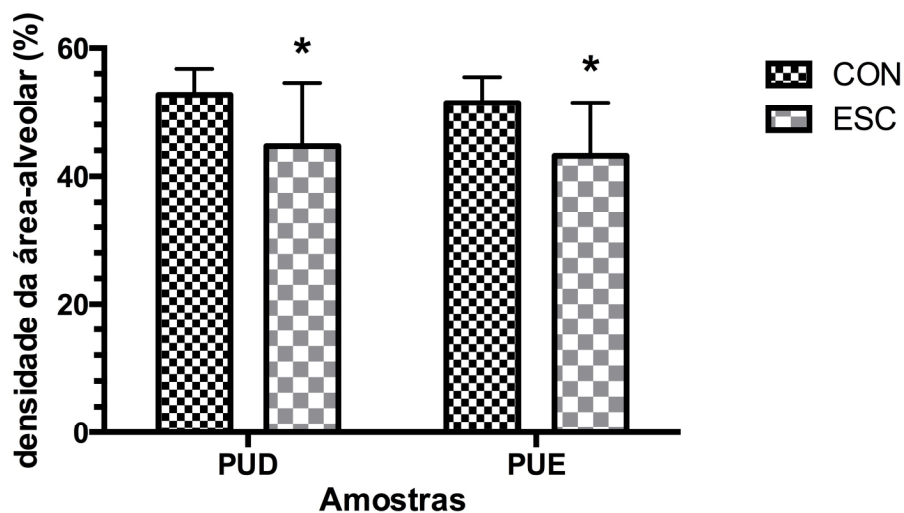


Figura 20 - Porcentagem de densidade da área alveolar no pulmão (PU) do lado convexo (esquerdo, E) e côncavo (direito D) dos grupos controle (CON) e escoliótico (ESC). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=10. \*p < 0,05 comparado ao CON ipsilateral.

Para finalizar, foi realizado a análise histologia do músculo paravertebral do grupo escoliótico, a fim de observar se houve comprometimento no tamanhos e no área de secção transversa das fibras, no entanto não houve diferença estatísticas entre os lados, conforme visto na figura 21.

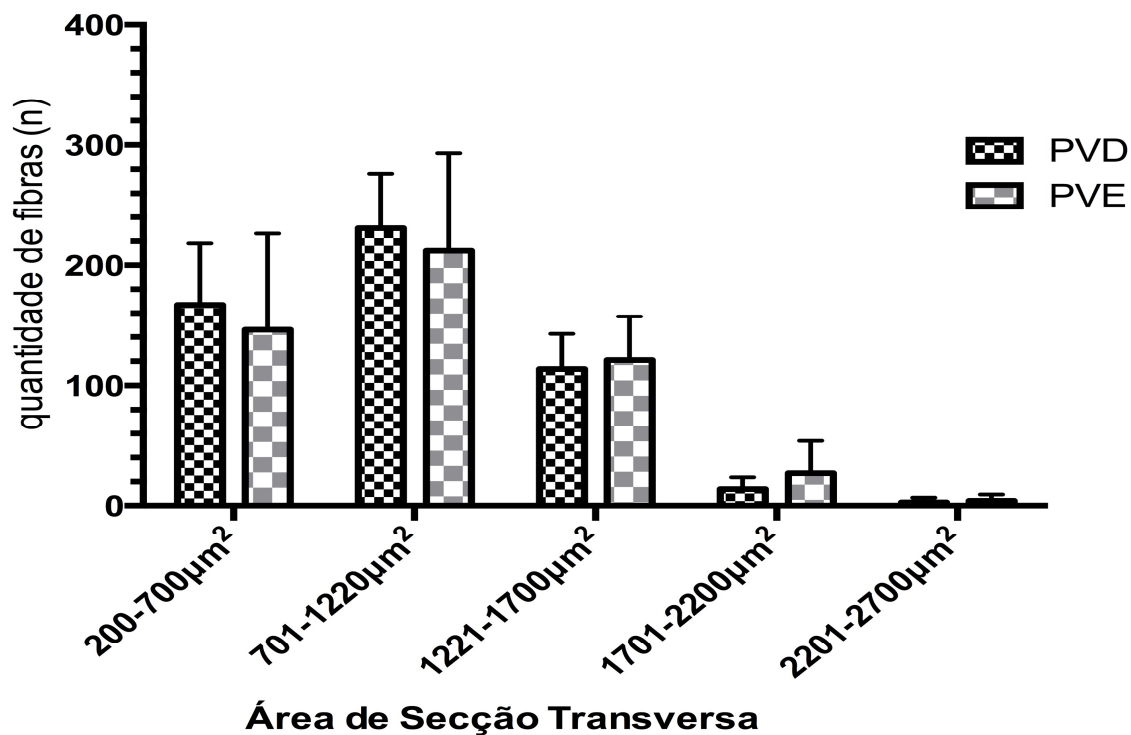


Figura 21 – Histologia do músculo paravertebral (PV) do lado convexo (esquerdo, E) e côncavo (direito D) do grupo escoliótico. Sendo, n a quantidade de fibras. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=10.



## 5 DISCUSSÃO

Estudos sobre escoliose na condição experimental podem ser de grande importância no que diz respeito à projeção de estudos em humanos. Assim, Gorman e Briden (2009) reforçam o fato de que a escoliose não é exclusiva dos humanos e nem tão pouco da postura bípede, haja vista que mamíferos, onívoros, répteis e anfíbios podem apresentar essa condição. No entanto, ainda sim alguns estudos empregam modelos extremamente invasivos, que se esforçam em estimular o desenvolvimento da escoliose por meio da postura bípede (Liu et al. 2011).

O modelo de indução aplicado no presente estudo é considerado simples comparado a outros modelos experimentais apresentados na literatura. Tal fato merece destaque, uma vez que, o desenvolvimento de um modelo de escoliose não invasiva é favorável ao fator replicabilidade em todas as fases, conforme pode ser observado no presente estudo.

Um fato importante a ser destacado sobre a metodologia, se deve a relevância da indução da curvatura escoliótica, haja vista que os métodos descritos na literatura, além de serem invasivos, não apresentam similaridade na forma de aplicação, uma vez que a mesma metodologia pode não ser replicada da mesma forma, de modo que o caráter invasivo influencia diretamente na replicação do modelo (Janssen et al., 2011).

No que diz respeito ao tempo, ou seja, 12 semanas de indução da curvatura escoliótica empregado no presente estudo, Sarwak et al. (1988) alegaram que no período de seis semanas já se tem a curvatura escoliótica, sendo que a partir da 12<sup>a</sup> semana de estudo a curvatura não progride mais, uma vez que isso foi observado em condição de caráter invasivo. Embora não seja um

estudo atual, é o mais completo e preciso em descrever a metodologia, haja vista que os animais foram acompanhados da 1ª à 12ª semana de estudo, em diferentes angulações de curvatura.

Silva et al. (2008) empenharam-se em desenvolver uma metodologia não invasiva em forma de coletes (anterior e posterior) aplicados até a 6ª e até a 12ª semana, que resultou em curvatura escoliótica sinistro convexa. Convém ressaltar, que os dispositivos foram trocados semanalmente, a fim de acompanhar o desenvolvimento corporal do animal, fato este que não é possível em casos cirúrgicos (invasivos). No presente estudo, a mesma metodologia foi realizada com sucesso.

Com foco no peso dos animais, constatou-se que os grupos escolióticos, apresentaram peso menor. É importante salientar que isso não se refere à perda de peso, uma vez que em nenhum momento os animais escolióticos apresentaram-se com peso corpóreo superior ao controle. Por outro lado, tem-se o peso do dispositivo que equivale a apenas 4,3% do peso corporal do animal, de modo que, seja improvável esse peso induziu o maior gasto energético devido a sustentação do dispositivo. Outro ponto importante se deve a correlação do peso do dispositivo com a aplicação prática, visto que Ueno et al. (2011) refere que 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 1º grau respectivamente, haja vista que é nessa fase em que as alterações de ordem patológica podem ser mais facilmente induzidas ou potencializadas.

No que se refere ao peso corporal, o índice de ingesta também não apresentou diferença entre os grupos avaliados na 11ª semana de indução escoliótica. Nem mesmo em nível hipotalâmico foi constatada alteração na

concentração do NPY e POMC, que poderia ser a justificativa para a causa do não aumento do peso, uma vez que esses peptídeos são marcadores de ingesta alimentar (Parâmetro avaliado, mas não inserido nesta dissertação).

Presume-se que o 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-Jandal et al. (2011), estudo em que os autores sugerem que alterações na absorção intestinal podem interferir diretamente no peso corporal.

O exame radiológico convencional reitera a indução da curvatura escoliônica e bem como a manutenção desta em períodos posteriores a retirada da coleta, como publicado por Silva et al. (2012). Do ponto de vista biomecânico e funcional, a metodologia de indução mostrou-se eficaz, ao passo que o grupo escoliônico apresentou curvatura escoliônica em “C” sinistro convexa com rotação vertebral, em nível toracolombar.

A fim de obter uma análise fidedigna, o presente estudo mensurou as curvaturas escoliônicas no software Alcimagem 2.1, por se assemelhar com a metodologia do ângulo de *Cobb*, que é o padrão ouro na mensuração da escoliose (Cunha, Rocha e Cunha, 2009).

Convém ressaltar que, muito embora Vrtovec, 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, com base no estudo de Sarwak et al (1988), que justificaram a existência de rotação vertebral no

modelo animal, ao correlacionarem a curvatura escoliótica com as articulações costovertebrais.

Referindo-se a angulação da curvatura escoliótica, estudos apontam que escolioses maiores que  $45^\circ$ , são consideradas graves e não apresentam resultados satisfatórios frente à intervenção não invasiva, sendo assim, a indicação é cirúrgica (Zaborowska-Sapeta et al., 2011; Sarwahy et al., 2011), situação encontrada no presente estudo, o qual avaliou a angulação na 12<sup>a</sup> semana de indução, constatando-se  $55^\circ \pm 2$  de curvatura sinistro convexa no grupo escoliótico.

Um dos fatores que indicam a intervenção invasiva em casos de escolioses com mais de  $45^\circ$ , se dá em torno do sistema cardiorrespiratório, uma vez que, quanto maior a angulação da curvatura, maior é o comprometimento desse sistema. Isso se deve a conformação da caixa torácica e sua relação com as vértebras torácicas, que na condição escoliótica podem sofrer rotação e alterar as dinâmicas ventilação/perfusão (Liu et al., 2010; Neira et al., 2011).

O sistema cardiorrespiratório tem sido alvo de investigações frente a escoliose, pelo fato de que as estruturas envolvidas na deformação estão diretamente correlacionadas anatomicamente e funcionalmente (Rowe et al., 2006). Nesse sentido, Liu et al. (2010), por meio de um estudo retrospectivo no período de 2007 a 2009, atestaram anormalidades cardíacas no eletrocardiograma em 36% dos indivíduos com escoliose idiopática, sendo a regurgitação tricúspide tida como anormalidade funcional mais comum (11,3%), enquanto que a comunicação interatrial apresentou-se como a anormalidade estrutural mais comum (8,7%).

Ainda é necessário considerar que a literatura está focada na avaliação

de humanos, assim, na década de 80, um grande estudo avaliou o perfil cardiovascular de 802 humanos escolióticos e não encontrou diferença entre diferentes parâmetros das ondas eletrocardiográficas (Hwang et al.,1982). Neste período, também foi realizada uma avaliação eletrocardiográfica em pacientes com escoliose severa e com cifose e não foi verificado diferença significativa sugerindo que mudanças eletrocardiográficas não tem correlação com as deformidades cifóticas ou escolióticas (Peter, 1987).

Há estudos que sugerem que desordens cardiovasculares frequentemente são detectadas em pacientes escolióticos, no entanto, estas alterações, sempre acompanham síndromes como por exemplo, a síndrome de Marfan's, ataxia de Friedreich's indicando uma forte relação gênica (Godfrey, 1970). Esta sugestão foi reiterada no estudo de Choudhry et al. (1988) onde foi verificada a presença de potencial evocado indutores de artefatos eletrocardiográficos representados por taquicardia supraventriculares, no entanto, este padrão ocorreu somente em crianças com a síndrome de Goldenhar .

Mais recentemente, Durmala et al. (2006) avaliaram 90 crianças portadoras de escoliose com idade variando de 7 a 18 anos e observaram que 44% dos pacientes apresentavam elevação no tempo do intervalo QRS e sugeriram que as alterações podem ter relações com desvios no eixo do coração induzido pela deformidade.

Stubgen (2008) relatou anormalidades na condução de potenciais elétricos na câmara ventricular direita em humanos portadores de síndrome da rigidez da coluna e sugeriram que esta alteração acompanha outros eventos como a taquiarritmia supraventricular em hipóxia ou a hipercapnia.

Para observar se há alterações cardíacas em ratos submetidos a escoliose, sem o comprometimento metabólico de técnicas invasivas, o presente estudo investigou o perfil elétrico do coração, nota-se que houve alteração no eixo elétrico ventricular, condição potencialmente induzida pela curvatura escoliótica. No entanto, não houve diferença na frequência cardíaca e nem na propagação dos sinais elétricos nas câmaras cardíacas.

O aspecto metabólico da musculatura também foi alvo de investigações, sendo que após a instalação da curvatura escoliótica, as reservas glicogênicas dos músculos paravertebrais apresentaram-se reduzidas e convém ressaltar que o hemitórax esquerdo (convexo) apresentou redução em maior severidade, porém sem significância estatística se comparada ao lado direito (côncavo). Isso evidencia a alteração metabólica do tecido muscular na condição escoliótica, que se mostrou em média 19,5% mais comprometida quando comparada ao controle.

É importante salientar que o músculo esquelético é dotado de uma capacidade estrutural e metabólica de se adequar as mais diversificadas condições impostas. Isso faz com que o músculo esquelético seja visto como o tecido mais mutável do corpo humano (Small et al., 2008).

Com base em estudo sobre escoliose em caráter experimental, Bylund et al. (1987), induziram escoliose em coelhos e constaram alterações miopáticas 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 foi atribuída a deformidade. É importante salientar, que no estudo supracitado a metodologia foi invasiva, mas não foi expressa de forma clara.

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

Do mesmo modo, estudos apontam 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. 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. Dessa forma, foi possível observar que indivíduos escolióticos apresentaram menor eficiência neuromuscular e nível de força 42,6% menor 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, fato este que contrariou os pressupostos previamente estabelecidos.

Dessa forma, o comportamento metabólico da musculatura dos animais escolióticos, foi uma resposta a modificações do comprimento muscular, haja vista que isso pode alterar o ponto em que o músculo gera tensão máxima, conforme apresentado pelo estudo de Savelberg e Meijer, (2003), que avaliaram a musculatura de ciclistas em diferentes condições do ciclo contração/relaxamento.

Em relação à análise de proteína total, foi observado valores reduzidos no grupo escoliótico, tendo diferença entre os músculo paravertebrais, com maior acometimento do músculo paravertebral esquerdo. Esses achados merecem destaque, uma vez que a relação comprimento tensão pode explicar o fato de um músculo alongado (convexo) ser favorável a síntese proteica. Porém, isso não necessariamente significa que essa condição é favorável ao melhor aporte energético (Aquino et al., 2007; Udaka et al., 2008).

Há décadas já é sabido que alterações do comprimento muscular estão associadas a deslocamentos da curva comprimento-tensão. Assim, o clássico estudo de Tabary et al. (1972) apresentou que o tecido muscular de animais, quando imobilizados em posição encurtada apresentam redução de 40% do número de sarcômeros em série, sendo que quando imobilizados em posição alongada demonstraram aumento de 19% do número de sarcômeros em série.

O estudo de Joe (1990), constituiu em desenvolver 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. Isso sugere que tal condição possa ter sido acompanhada de alteração metabólica, conforme os achados do presente estudo.



Em relação a tipagem de fibra muscular, a análise histoquímica da musculatura paravertebral de coelhos apresentou proliferação de conjuntivo, infiltrado de tecido adiposo, excesso de núcleo central, reação inflamatória, seguida de hipertrofia de fibras tipo I e II em ambos os lados da coluna (côncavo/convexo). Esse estudo cogitou a hipótese de que a metodologia (transversectomia) de indução foi responsável por esses achados (Werneck et al., 2008). Ainda que o tipo de fibra pode determinar o metabolismo.

No que diz respeito ao lado côncavo e convexo, estudos prévios demonstraram que o músculo esquelético é dotado de uma capacidade plástica que pode aumentar ou reduzir seu tamanho em comprimento. Com atenção na redução do comprimento muscular, é necessário elucidar que a manutenção na posição encurtada pode favorecer o aparecimento de contraturas musculares (Endlich et al., 2009). Dessa forma, os animais submetidos a indução escoliótica podem estar sujeitos a alterações desencadeadas pela redução do ciclo alongamento/encurtamento, possivelmente diminuindo a concentração de proteína total, algo visto no grupo escoliótico em comparação ao controle.

Gomes et al. (2004), atestam que contratura muscular é o encurtamento de um músculo ou de outros tecidos moles que cruzam uma articulação, fato este que resulta em limitação da mobilidade articular e consequente hipotrofia muscular. Nesse contexto, sugere-se que no presente estudo os achados referentes à proteína total, se devem a contratura e não a imobilização.

Uma limitação apontada pela literatura e também encontrada no presente estudo, é o fato de que os modelos experimentais desenvolvidos em animais, não estão sujeitos a carga axial, conforme a coluna do ser humano.

Mesmo que métodos se esforcem em reproduzir esse tipo de carga, por conta de fatores morfológicos e funcionais, as estruturas humanas e animais apresentam respostas diferenciadas (Janssen et al., 2011).

De forma consensual, a literatura é vasta quanto aos efeitos da imobilização/contensão no tecido muscular, que responde com hipotrofia, alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais, tudo isso culminando em alteração funcional da musculatura envolvida. Nesse sentido, a estrutura e função dos músculos esqueléticos estão atreladas pela atividade proprioceptiva, inervação motora, carga mecânica imposta ao tecido, ciclos de estiramento/encurtamento e mobilidade articular. O comprometimento de um dos fatores citados, certamente irá impactar em atividade catabólica que culmina em hipotrofia/atrofia (Ferreira et al., 2004).

Ao integrarmos os dados deste estudo podemos verificar que houve aumento na fosforilação do IRS1 em serina e pode ser uma das causas na redução da funcionalidade do GLUT 4, diminuindo a translocação de glicose em adipócitos e em músculos esquelético (Tanti et al., 1994), conseqüente reduzindo o conteúdo de glicogênio observado no músculo paravertebral convexo com maior severidade, quanto no côncavo do grupo escoliótico, considerando-se que este músculo se encontra encurtado e em um status metabólico diferenciado. Essa situação pode ser encontrada com taxas baixas de fosforilação de IRS-1, algo encontrado no grupo escoliótico, sendo que a alta fosforilação em serina pode levar a uma condição patológica ou mesmo à quadros de resistência insulínica (Gual, Le Marchand-Brustel e Tanti, 2004).

Ainda, uma ativação constante do IRS-1 por tirosina pode promover o crescimento celular e desencadear respostas contra a apoptose, condição

encontrada frequentemente em indivíduos com câncer, os quais utilizam medicamentos para promover a fosforilação em serina (Mamay et al., 2003; Gual, Le Marchand-Brustel e Tanti, 2005).

Neste contexto, foi observado que a fosforilação da enzima AKT, a qual se demonstrou alta no músculo paravertebral esquerdo (convexo) em comparação ao músculo paravertebral direito (côncavo) e ao grupo controle, uma vez que a regulação da síntese de glicogênio necessita da fosforilação da enzima AKT que pode fosforilar e inativar a GSK-3 diminuindo a ativação da glicogênio-sintetase (Cross et al., 1995), resultando em baixas taxas de glicogênio, afim de realizar ativação da p70S6K para iniciar a cascata da mTOR e iniciar o processo de síntese de proteínas, uma vez que os níveis das enzimas p70S6K e mTOR estão elevados no músculo paravertebral esquerdo.

Com relação a fosforilação da enzima AMPK foi observado menor fosforilação no músculo paravertebral convexo contribuindo para as menores reservas glicogênicas, em consequência da ativação rápida da AMPK ser originada de estresses metabólicos como exercícios físicos, estados de hipóxia, hiperosmolaridade, a fim de recuperar os valores da glicemia através do equilíbrio metabólico musculo esquelético, hepático e adiposo (Long e Zierath, 2006). Possivelmente, tais situações estressoras não ocorreram pelo estado de imobilização muscular ocasionado pelo colete, ainda demonstra não realizar ativação da enzima mTOR.

Quando a fosforilação da enzima p70S6K foi observado maiores valores no lado convexo indicando que acompanha a dinâmica da enzima mTOR responsável pelo crescimento e proliferação celular, sendo que os valores altos da mTOR podem ser justificados em decorrência da fosforilação em serina do

IRS-1, uma vez que esse mecanismo envolve caminhos de sinalização da mTOR, aumentando sua fosforilação (Carlson, White e Rondinone, 2004). O valor elevado da mTOR, ainda pode ser explicado pelo aumento da atividade da enzima AKT.

Observando a área de secção transversa do músculo paravertebral dos ratos escolióticos, não foi evidenciado situação de atrofia muscular, algo encontrado na imobilização ou desnervação muscular (Fernandes et al., 2005; Smith et al., 2000), demonstrando que o método de indução por Silva et al. (2012) não gera alterações deletérias além das ocasionadas pela escoliose.

Já é sabido que pacientes com escoliose, os quais apresentam quadros de rotação vertebral, têm uma deficiência no sistema respiratório diminuindo os volumes pulmonares (Takahashi et al., 2007; Newton et al., 2005), porem não há análises histológicas do tecido pulmonar em modelos experimentais não invasivos desta patologia, assim o presente estudo observou a densidade de área-alveolar. Visto que o grupo escoliótico demonstrou valores inferiores na área alveolar em relação ao grupo controle, concluí-se que os animais apresentam comprometimento tanto nos volumes pulmonares como nos tecidos alveolar responsáveis pela perfusão.

## CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

1. Em relação ao rato escoliótico não crescer é importante ressaltar que a capacidade do sistema ósseo atingir seu crescimento máximo depende de fatores hormonais, nutricionais e físicos (cargas axiais). As cargas axiais sobre o esqueleto que são proporcionadas pela gravidade e pelas contrações musculares (gerando o efeito piezoelétrico sobre os cristais de

hidroxiapatita do osso). Se ele se desloca menos com o colete, é possível que o esqueleto esteja sendo menos estimulado.

2. Se o colete é colocado em uma fase de grande estímulo para o crescimento deve-se considerar que o colete (a órtese) engloba cerca de +/- 80% do corpo todo do animal, o que pode ter grande repercussão no crescimento dele como um todo (a estrutura esquelética sofrendo menores influências das forças físicas). Assim mesmo, se ele se deslocar igual aos outros ratos, é possível que o seu esqueleto ainda esteja sendo menos estimulado. Por outro lado, o músculo cresce por estímulos de tração que os ossos em crescimento exercem sobre eles. Se os ossos crescem menos, os músculos irão acompanhar essa tendência. Segundo a lei de Wolf, a estrutura menos estimulada irá ter menor desenvolvimento.
3. Em relação aos músculos, a proteogênese muscular proporciona hipertrofia e hiperplasia, o que certamente resultaria num índice maior na relação proteínas totais/DNA. No animal escoliótico, acredita-se que possa ocorrer o seguinte:
  - Vamos lembrar que o colete trará imobilização. Portanto 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 e pela princípio da adaptabilidade, ele terá um estímulo para desenvolver a hiperplasia (aumento dos sarcômeros em série).

4. O lado côncavo acaba sendo mais funcional para o rato pela maior facilidade que ele encontrará em atuar a favor do lado côncavo, o que poderá também gerar diferenças em algumas análises entre os lados.

## 6 CONCLUSÃO

1- O período de 12 semanas promoveu a curvatura escoliótica; comprovado pela presença da curvatura com rotação vertebral mesmo sem o colete.

2-As alterações constatadas nos grupos escolióticos sugerem alteração no padrão energético da musculatura paravertebral, fato que indica um diferencial metabólico entre as curvaturas côncavas e convexas.

3- As alterações metabólicas acompanham as diferenças na atividade das vias insulínicas sendo um fator adicional na alteração vertebral clássica da escoliose.

4- Na escoliose o tecido pulmonar apresentou alterações na densidade alveolar, indicando comprometimento na homeostasia respiratória.

5- Sugere-se que novos estudos possam reavaliar as diferentes metodologias aplicadas no tratamento da escoliose podendo contribuir para o aprimoramento de protocolos aplicados em indivíduos que sofrem com as deformidades causadas pela escoliose.

## 7 REFERÊNCIAS\*

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; 214(16): 2791-8.

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.

Anand N, Baron EM. Minimally Invasive Treatment of Adult Scoliosis. *Seminars in Spine Surgery.* 2010; 23(1):66-71.

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: 6<sup>o</sup> Mostra Acadêmica da UNIMEP - XVI Congresso de Iniciação Científica; 2008. Piracicaba. Anais da 6<sup>o</sup> 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.

Benacerraf BR, Green MF, Barss VA. Prenatal sonographic diagnosis of congenital hemivertebra. *J Ultra-sound Med,* 1986; 5:257-9.

Benner B, Ehni G. Degenerative lumbar scoliosis. *Spine,* 1979; 4(6):548-52.

Boachie-Adjei O, Lonner B. Spinal deformity. *Pediatr Clin North Am.* 1996; 43(4):883-97.

Bonorino KC, Borin GS, Silva AH. Tratamento para escoliose através do método isostretching e uso de bola suíça. *Cinergis.* 2008; 8(2):1-5.

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; 214: 222-8.

Carlson CJ, White MF, Rondinone CM. Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 316(2):533-539.

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

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

Choudhry DK, Stayer AS, Rehman MA, Schwartz RE. Electrocardiographic artifact with SSEP monitoring unit during scoliosis surgery. Paediatr Anaesth. 1998; 8(4):341-343.

Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. The 1996 Guide for the care and use of laboratory animals. ILAR J. 1997; 38(1):41-48.

Costa A, Sousa SG, Oliveira A. A escoliose em pediatria. Saúde Infantil, 2002; 24(1):39-45.

Costa D. Fisioterapia Respiratória Básica. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap 1 e 6.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature. 1995; 378:785-9.

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.

Dimeglio A. Ortopedia Pediátrica, São Paulo, Editora Santos, 1990.

Durmala J, Sosnowska M, Sosnowski M. Prevalence of subtle cardiac electrical abnormalities on children with idiopathic scoliosis. Stud Health Technol Inform. 2006; 123:425-430.

Endlich PW, Farina GR, Dambroz C, Gonçalves WLS, Moyses MR, Mill JG, Abreu GR. Efeitos agudos do alongamento estático no desempenho da força dinâmica em homens jovens. *Rev Bras Med Esp*. 2009;15:200-3.

Feltrim MIZ, Jardim JRB. Movimento toracoabdominal e exercícios respiratórios: revisão da literatura. *Rev Fisioter Univ São Paulo*. 2004; 11(2):105-113.

Fernandes KCB, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF, Fuentes CB, Teodori RM. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter*. 2005; 9(2):235-41.

Ferreira DMA, Defino HLA. Estudo clínico da mensuração da gibosidade e suas correlações com as medidas radiológicas na escoliose idiopática. Ribeirão Preto, 1999. 76 p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensão A, Magalhães J, Duarte J, Amado F. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*. 2004; 4: 94-111.

Fluck M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol*. 2006; 209(12):2239-48.

Godfrey S. Respiratory and cardiovascular consequences of scoliosis. *Respiration*. 1970; 27(1): 67-7.

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 Musculoskelet Disord*. 2005 Mar; 10: 6:14.

Gomes ARS, Coutinho EL, Franca CN, Polônio J, Salvini TF. Effects of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 1473-80.

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

Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005, 87(1):99-109.

Hwang B, Simon G, Keim HA, Krongrad E. The electrocardiogram in patients with scoliosis. *J Electrocardiol*. 1982; 15(2):131-136.

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.

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

Kumar S, Kela AK, Mehta VL, Shukla AK. Preferred anesthetic agents in experimental cardiology: A study on rat electrocardiogram. *Indian J Pharmacol*. 1995; 27:127-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.

Liu L, Xiu P, Li Q, Song Y, Chen R, Zhou C. Prevalence of cardiac dysfunction and abnormalities in patients with adolescent idiopathic scoliosis requiring surgery. *Orthopedics*. 2010; 33(12): 882 -88

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 (Phila Pa 1976)*. 2011 Aug; 36(17):1340-9.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. 2006; 116(7):1776-83.

Lonstein JE. *Moe's Textbook of Scoliosis and Other Spinal Deformities*. 3. ed. Philadelphia: WB Saunder Company, 1995; 219–256.

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.

Mamay CI, Ming-Sion AM, Wolf DM, Molina MD, Van Den Berg CL. An inhibitory function for JNK in the regulation of IGF-I signaling in breast cancer. *Oncogene.* 2003; 22(4):602-14.

Mandarim-De-Lacerda C, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Imagen analysis and quantitative morphology. In: Hewitson TD, Darby JA (Editors), *Histology Protocols: methods in molecular biology.* New Jersey: Human Press. 2010; 211-25.

Mathieu JAB, Ramos SG, Meirelles MS, Verceze AV, Arantes MR, Vannucchi H. Efeitos da quercetina na lesão pulmonar induzida por bleomicina: um estudo preliminar. *J Bras Pneumol.* 2008; 34(7): 445-52.

Mordecai SC, Dabke HV. Efficacy of exercise therapy for the treatment of adolescent idiopathic scoliosis: a review of the literature. *Eur Spine J.* 2012; 21(3):382-9.

Neira VM, Gardin L, Ryan G, Jarvis J, Roy D, Splinter W. A transesophageal echocardiography examination clarifies the cause of cardiovascular collapse during scoliosis surgery in a child. *Can J Anaesth.* 2011; 58(5):451-5.

Newton PO, Faro FD, Gollogly S, Betz RR, Lenke LG, Lowe TG. Results of preoperative pulmonary function testing of adolescents with idiopathic scoliosis. A study of six hundred and thirty-one patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87:1937-46.

Ni H, Zhu X, He S, Yang C, Wang C, Zhao Y, et al. An increased kyphosis of the thoracolumbar junction is correlated to more axial vertebral rotation in thoracolumbar/lumbar adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2010 Nov; 35(23):E1334-8.

Nogami H, Terashima Y, Tamaki K. Congenital kyphoscoliosis and spinal cord lesion produced in the rat by beta-aminopropionitrile. *Teratology.* 1977; 16(3):351-77.

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):219-24.

Peters S. Electrocardiography changes in scoliosis and kyphosis deformities of the thorax. *Z. Orthop Ihre Grenzgeb.* 1987; 125(1):14-18.

Posadzki P, Ernst E. Spinal manipulation: an update of a systematic review of systematic reviews. *N Z Med J.* 2011;124(1340):55-71.

Rigo MD, Grivas TB. Rehabilitation schools for scoliosis thematic series: describing the methods and results. *Scoliosis.* 2010 Dec; 24:5-27.

Roso V, Bitu SO, Zanoteli E, Beteta JT, de Castro RC, Fernandes AC. Surgical treatment of scoliosis in spinal muscular atrophy. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003; 61(3A):631-8.

Rowe DE, Feise RJ, Crowther ER, Grod JP, Menke JM, Goldsmith CH, et al. Chiropractic manipulation in adolescent idiopathic scoliosis: a pilot study. *Chiropr Osteopat.* 2006; 21:14-5.

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

Sarwahi V, Wollowick AL, Sugarman EP, Horn JJ, Gambassi M, Amaral TD. Minimally invasive scoliosis 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, Bunnell WP. Experimental scoliosis in the rat. I. Methodology, anatomic features and neurologic characterization. *Spine (Phila Pa 1976).* 1988 May; 13(5):466-71.

Shi L, Wang D, Driscoll M, Villemure I, Chu WC, Cheng JC, et al. Biomechanical analysis and modeling of different vertebral growth patterns in adolescent idiopathic scoliosis and healthy subjects. *Scoliosis.* 2011 May; 23:6-11.

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

Silva CA, Guirro RRJ, Fonseca W, Arruda EJ, Grasso DO. Assessment of rat behavior with induced scoliosis by polyvinil choride vest. *Jour Chin Clinic Med.* 2008; 3(11):621-6.

Silva FE, Lenke LG. Adult degenerative scoliosis: evaluation and management. *Neurosurg Focus.* 2010; 28(3):E1.

Silva LC. *Compendio de pneumologia.* 2<sup>o</sup> ed. São Paulo: Fundo editorial BKY; 1991.

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

Small K, Mc Naughton L, Matthews M. A Systematic Review into the Efficacy of Static Stretching as Part of a Warm-Up for the Prevention of Exercise-Related Injury. *Res Sports Med.* 2008; 16(3) :213-31.

Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res.* 2000; 302:235-41.

Smith RM, Pool RD, Butt WP, Dickson RA. The transverse plane deformity of structural scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1991; 16(9):1126-9.

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.

Stokes LA, Armstrong JG, Moreland MS. Spinal deformity and back surface asymmetry in idiopathic scoliosis. *J Orthop Res.* 1988; 6(1):129-37.

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.

Takahashi S, Suzuki N, Asazuma T, Kono K, Ono T, Toyama Y. Factors of thoracic cage deformity that affect pulmonary function in adolescent idiopathic thoracic scoliosis. *Spine.* 2007; 32:106-12.

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

Tangsrud SE, Carlsen KC, Lund-Petersen I, Carlsen KH. Lung function measurements in young children with spinal muscle atrophy; a cross sectional survey on the effect of position and bracing. Arch Dis Child. 2001; 84(6):521-4.

Tanti JF, Gremeaux T, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. J Biol Chem. 1994; 269(8):6051-7.

Trobisch P, Suess O, Schwab F. Idiopathic scoliosis. Dtsch Arztebl Int. 2010 Dec; 107(49):875-83.

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.

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.

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

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.

White MF. The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. Mol Cell Biochem. 1998 may; 182(1-2):3-11.

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.

---

Ceccotti HM, Sousa DD. Manual para normalização de dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, UNIMEP; 2006. Disponível em <http://www.unimep.br/ppgft>