

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**



EDER JOÃO DE ARRUDA

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO PARA
IMOBILIZAÇÃO PÉLVICA E EFEITOS DA
FOTOBIMODULAÇÃO (830 nm) NO TECIDO MUSCULAR
EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: ESTUDO
EM RATOS.**

SÃO CARLOS
2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

Eder João de Arruda

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO PARA
IMOBILIZAÇÃO PÉLVICA E EFEITOS DA
FOTOBIMODULAÇÃO (830 nm) NO TECIDO MUSCULAR
EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: ESTUDO
EM RATOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do Título de Doutor em Fisioterapia. Área de Concentração: Avaliação e intervenção em fisioterapia do sistema músculo-esquelético.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eder João de Arruda, realizada em 20/02/2017:



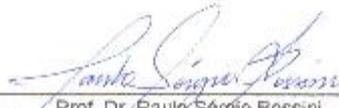
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
UFSCar



Prof. Dr. Cleber Ferraresi
USC



Prof. Dr. Richard Eluin Liebaro
UFSCar



Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini
USC



Profa. Dra. Tatiana de Oliveira Sato
UFSCar

Dedicatória

A meus pais, que de forma incondicional me deram todo apoio necessário para que eu pudesse dar mais esse importante passo. Eternamente grato a vocês pelo dom da vida! Dedico a vocês...Lazara (in memoriam), Cleusa e Firmino.

Dedico ao meu orientador, Prof Nivaldo Antonio Parizotto e Co-orientador, Prof Carlos Alberto da Silva. Onde quer que minhas capacidades científicas possam atingir, com certeza vocês estarão envolvidos em todas as futuras transformações que farei em honra a luz do conhecimento que me proporcionaram nessa jornada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, que desde o primeiro encontro mostrou-se um ser humano impar que está seriamente comprometido com a evolução humana no mais amplo sentido dessa expressão. Obrigado pela infinita compreensão, paciência e apoio nessa jornada magna do doutorado que tive a honra de ser guiado por esse ser humano exemplar que es tu. Obrigado pelo grande fator de impacto positivo que causaste em minha vida. Seus valores morais, éticos e profissionais são fonte de inspiração profissional e pessoal.

Sou grato a meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, meu pai científico que desde a graduação confiou em minhas capacidades e de forma muito paciente trabalhou em meu processo de lapidação. Você é um ser humano extraordinário que na terra tem se dedicado a ajudar as pessoas. Ajuda desde a época da motinha na chuva até os dias atuais! Graças a Deus você existe e te encontrei nessa jornada! Você mudou minha vida! Desejo-te vida longa e com muita saúde! Conte comigo sempre “pai careca”! Gratidão infinita!

Agradeço ao Prof. Dr. Luciano Júlio Chingui, que acreditou em meu trabalho e me proporcionou a magnífica e desafiadora experiência de trabalhar no continente africano para estruturar e dirigir o curso de fisioterapia da Universidade Metodista de Angola. As transformações que lá foram feitas são indescritíveis e irão ecoar pela eternidade. Obrigado pela compreensão que me possibilitou concluir a jornada de forma conciliada ao doutorado. Desejo-te vida longa. Gratidão.

Agradeço imensamente a Prof^a Ms. Rafaela Ferreira, ou simplesmente Rafa, que é colega de grupo de pesquisa, colega de profissão, amiga, conselheira, companheira, linda, colorida, brilhante fisioterapeuta, ótima professora, pesquisadora promissora e fantástica mãe de nosso lindo filho, Miguel Ferreira de Arruda. Rafa, você foi essencial durante todo o desenvolvimento e conclusão desse passo. Desde a época em que emprestou seus próprios dedos para testes de materiais e me esperava em frente ao Market nas tardes de domingo para aplicação de laser nos ratos, até os dias em que suportou as dores das partidas e alegrias das chegadas no terminal 2 do aeroporto de Guarulhos. Até aqui foi bem difícil e só foi possível porque vocês foram pacientes e me deram todo apoio necessário. Você e nosso pequenino foram a energia inspiradora para que eu pudesse seguir sempre para frente e para cima. Eternamente grato por você existir e por ter lhe encontrado nessa vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de transitar nesse espaço de tempo chamado vida.

Agradeço a meus pais Lasara (in memorian), Cleusa e Firmino por terem empenhado duro esforço na criação da estrada pela qual tenho caminhado.

Sou grato a meus irmãos Everton, Lasara e Adriana por serem fonte de inspiração.

Agradeço ao meu sogro Gerson Ferreira e minha sobra Sueli Ferreira, por tudo que representam em minha vida.

Agradeço a minha equipe de trabalho em Angola, Prof^o Luciano Chingui, Prof^a Rafaela Ferreira, Prof^a Izaquiela Costa, Prof^a Daniela Ike, Prof^o Damião Ngonga, Prof^a Cristina Kuviena, Prof^a Zinaida e a todas as outras pessoas que conheci enquanto lá estive.

Aos colegas de laboratório Rafaela Ferreira, Ana Andrade, Cintia, Tatmatsu, Jefferson Kitamura, André Mascarin, Vitor Pezolato e a todos os outros que compartilharam da jornada do doutorado.

Aos professores do PPGFT-UFSCar

Agradeço aos professores da banca que se dispuseram em mais de 5 horas de banca construtiva: Prof^o Dr. Cleber Ferraresi, Prof^o Dr. Richard Liebano, Prof^o Dr. Paulo Bossini e Prof^a Dra. Tatiana Sato.

A todos os funcionários da UFSCar em especial aos do PPGFT. São vitais.

A CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que aqui não são citadas, mas tiveram participação direta ou indireta nesse passo

Agradeço a todas as pessoas que se aproximaram e todas as que se afastaram nessa jornada do doutorado.

Aos ratos utilizados nos estudos.

“Sempre permaneça aventureiro. Por nenhum momento se esqueça de que a vida pertence aos que investigam. Ela não pertence ao estático; Ela pertence ao que flui. Nunca se torne um reservatório, sempre permaneça um rio.”

Osho.

Estudo realizado no programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em parceria com o Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba.

APRESENTAÇÃO

Esse trabalho teve como objetivo elucidar uma opção anestésica mais segura/controlada para ser utilizada em estudos experimentais, além de desenvolver um modelo de imobilização pélvica para ratos, que envolve grandes grupos musculares e ainda possibilitou o estudo dos efeitos da fotobiomodulação (do inglês PBM) por laser (830nm) no tecido muscular durante e após o período de imobilização.

O presente trabalho foi estruturado em conformidade com as “NORMAS COMPLEMENTARES Nº 02/2006 – PPGFt - UFSCar” aprovada em 22/02/2010. Assim, foi estruturada em três partes, onde a primeira apresenta resumo geral, contextualização, hipóteses, bem como os objetivos gerais e específicos que guiaram os estudos. A segunda parte apresenta três estudos, de modo que o primeiro objetivou elucidar a melhor opção anestésica com menor influência no metabolismo da glicose em animais de experimentação, denominado: “Alteração no metabolismo da glicose sob diferentes anestésicos: estudo em ratos”, o qual foi submetido ao periódico “*Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*” (Anexo A).

O segundo estudo propõe a estrutura e aplicação de um modelo de imobilização pélvica para ratos, que avalia o aspecto químiometabólico, denominado: “Proposta de um modelo não invasivo para imobilização pélvica: Estudo em ratos”, submetido ao periódico “*PM & R (PHILADELPHIA,2009): The Journal Of Injury, Function And Rehabilitation*” (Anexo B). O terceiro estudo denominado: “Influência da terapia laser de baixa intensidade (830nm) no metabolismo muscular e concentrações de citocinas durante e após imobilização pélvica: Estudo em ratos”, foi submetido ao periódico “*Experimental Physiology*” (Anexo C) e apresenta os efeitos da fotobiomodulação *laser* durante e após o período de imobilização pélvica. Os artigos que compõe a presente tese estão em conformidade com as normas dos respectivos periódicos aos quais foram submetidos.

A terceira e última parte da tese é constituída por considerações finais apontadas a partir dos resultados experimentais, anexos e referências bibliográficas utilizadas na contextualização da presente tese.

ARRUDA, Eder João. Desenvolvimento de dispositivo para imobilização pélvica e efeitos da fotobiomodulação (830 nm) no tecido muscular em diferentes condições experimentais: estudo em ratos. 2017, 150 f. Tese (Doutorado em Fisioterapia) Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

RESUMO

Os efeitos da fotobiomodulação por terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) no tecido muscular são bem conhecidos. No entanto, não se encontra na literatura estudos que tenham verificado a aplicação de LLLT na musculatura pélvica sob desuso em caráter experimental. A presente tese concentrou suas análises em três vertentes: Apontar a opção anestésica que menos interfere no metabolismo da glicose, tendo em vista que o tecido muscular é um dos principais sítios envolvidos na regulação glicêmica (estudo I), de modo que os resultados provenientes desse estudo pudessem favorecer o desenvolvimento de um modelo experimental aplicado na imobilização da cintura pélvica de ratos (estudo II) e avaliar sua efetividade, por meio da resposta quimiometabólica, da musculatura envolvida e diante do quadro de atrofia muscular, buscou-se então avaliar se há reversão (estudo III) por meio da aplicação da LLLT durante e após o período de imobilização pélvica. Os três estudos foram realizados com 80 ratos machos da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com idade de 3 a 4 meses e massa corporal 250 ± 50 g, distribuídos em diferentes grupos experimentais. Para a avaliação estatística, no estudo I os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido da aplicação da análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Nos estudos II e III os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA e teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de $p < 0,05$. O *estudo I* foi realizado com 32 ratos Wistar, idade entre 3 a 4 meses, massa corporal 250 ± 50 g, que foram distribuídos em oito grupos ($n=4$), dos quais 4 grupos foram submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT) e outros 4 submetidos ao teste de tolerância a insulina (ITT). Os anestésicos utilizados foram: Tiopental sódico (T, 40 mg/kg peso, ip), Zolazepan (Z, 50 mg/kg peso, ip), Ketamina-Xilasina (KX, 35 mg/kg peso e 4 mg/kg peso, ip) e Tribromoetanol (TRI, 250mg/kg peso, ip). Concluiu-se que os anestésicos tiopental e tribromoetanol são os mais seguros por não interferirem nas dinâmicas de controle glicêmico. No *estudo II* foram utilizados 18 ratos distribuídos em três grupos ($n=6$): controle (C), imobilização pélvica por 7 dias (IP) e remobilizado por 7 dias após 7 dias de uso do dispositivo (RP7). Constatou-se que houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, onde as reservas glicogênicas da musculatura pélvica foram reduzidas em média 68% no grupo IP e 50% no grupo (RP7). A constante de decaimento (KITT) revelou retardo de 10% no grupo IP. A razão proteína total/DNA mostrou que houve redução de 28% e 24% no glúteo máximo e 32% e 16% no iliopsoas dos grupos IP e RP7, respectivamente. Na avaliação da concentração sérica de interleucina 6 houve elevação de 27,3% no grupo IP e 19,2% no grupo RP7 comparados ao C. A interleucina 10 expressou elevação de 30,4% e 14,9% nos grupos IP e RP7, respectivamente. O fator de necrose tumoral (TNF- α) apresentou discreta, porém significativa elevação de 5% somente no grupo IP comparado ao grupo C. Portanto, o modelo desenvolvido mostrou-se eficaz em mimetizar os efeitos deletérios do desuso, efeitos esses que não foram reestabelecidos após a remoção do modelo. Com base nos achados supracitados, o *estudo III* utilizou 30 ratos distribuídos em cinco grupos ($n=6$), sendo; Controle (C), Imobilização pélvica (IP), Imobilizado 7 dias e remobilizado por 7 dias (IR), Laser durante imobilização pélvica (LDIP) e Laser após imobilização pélvica (LAIP). Assim, a

LLLT (Ga-Al-As, contínuo; $\lambda = 830 \text{ nm}$; $P = 30 \text{ mW}$; área do feixe = $0,116 \text{ cm}^2$, $T = 14 \text{ s}$; fluência de $3,62 \text{ J/cm}^2$; $E = 0,42 \text{ J}$; Densidade de potência de $0,25 \text{ mW/cm}^2$) foi aplicada em 8 pontos por 7 dias consecutivos. Esse estudo revelou que frente a imobilização pélvica na condição experimental, a LLLT pode minimizar o catabolismo ao favorecer a elevação nas reservas glicogênicas da musculatura pélvica, melhorar a relação proteína total/DNA, reduzir a (IL-6 e TNF- α) atividade pró-inflamatória e aumentar (IL-10) a atividade anti-inflamatória, principalmente quando a LLLT foi aplicada durante o período de imobilização, propiciando que o músculo esquelético mantenha melhores condições metabólicas e estruturais mesmo sendo submetido ao desuso. Por fim, esse trabalho teve êxito em elucidar os anestésicos tiopental e tribromoetanol como os que menos interferem no metabolismo da glicose, de modo que isso favoreceu o desenvolvimento de um modelo experimental de desuso com acentuado catabolismo muscular, que pode ser atenuado por meio da fotobiomodulação (830 nm).

Palavras-chave: Músculo, imobilização pélvica, anestesia, fotobiomodulação, laser, ratos.

ARRUDA, Eder João. Development of devices for pelvic immobilization and photobiomodulation effects (830 nm) in muscle tissue under different experimental conditions: study in rats. 2017, 150 f. Thesis (Doctored in Physiotherapy) Postgraduate Program in Physiotherapy, Federal University of São Carlos, São Carlos, 2017.

ABSTRACT

The effects of photobiomodulation by low level laser therapy (LLLT) on muscle tissue are well known. However, it is not found in the literature studies about the application of LLLT in the pelvic musculature under experimental disuse. The present thesis focused its analysis on three aspects: point out the anesthetic option which interferes the least in the metabolism of glucose, considering that muscle tissue is one of the main sites involved in glycemic regulation (study I), thus the results from this study could support the development of an non invasive pelvic immobilization model in rats (study II) and evaluate its effectiveness, through the chemo-metabolic response of the involved musculature before the muscular atrophy. Then we sought to evaluate if there is reversal of this muscle conditions (study III) by applying LLLT during and after the pelvic immobilization period. The three studies were performed with 80 male rats divided into different experimental groups. For the statistical evaluation, in study I the data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test, followed by the ANOVA and Tukey test. In studies II and III the data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test followed by ANOVA and Tukey's test (a critical level of $p < 0.05$ was established). In study we used 32 Wistar rats ($n = 4$), aged between 3 and 4 months, weighing 250 ± 50 g, distributed in eight groups, of which 4 groups were submitted to the glucose tolerance test (GTT) and another 4 submitted to the insulin tolerance test (ITT). We compared four anesthetics: Thiopental sodium (T, 40 mg/kg), Zolazepan (Z, 50 mg/kg), Ketamine-Xylazine (K, 35 mg/kg and 4 mg/kg) and Tribromoethanol (TRI, 250mg/kg). We concluded that Thiopental and Tribromoethanol anesthetics are the safest because they do not interfere in the glycemic control dynamics. In the study II, we distributed 18 rats were in three groups ($n = 6$): control (C), pelvic immobilization for 7 days (PI) and remobilized for 7 days after 7 days of device use (RP7). We found a difference ($p < 0.05$) between groups: pelvic muscle glycogen reserves were reduced by 68% in the PI group and 50% in the RP7 group. The group PI had a delay of 10% in the glucose decay constant (KITT). Considering the total protein/DNA ratio groups PI and RP7 presented a reduction of 28% and 24% in the gluteus maximus and 32% and 16% in the iliopsoas, respectively. In the evaluation of the serum concentration of interleukin 6, the group PI had an increase of 27.3% and RP7 19.2% compared to the C. Interleukin 10 increased 30.4% and 14.9% in the IP and RP7 groups, respectively. Tumor necrosis factor (TNF- α) presented a discrete but significant increase of 5% only in the PI group compared to group C. Therefore, the experimental model proved to be effective in mimicking the deleterious effects of disuse, and this effects were not recovered after removing the immobilization device. Based on this findings, study III used 30 rats distributed in five groups ($n=6$), being; Control (C), Pelvic Immobilization (PI), Immobilized 7 days and remobilized for 7 days (IR), Laser during pelvic immobilization (LDPI) and Laser after pelvic immobilization (LAPI). Thus, the LLLT (Ga-Al-As, continuous $\lambda = 830$ nm, $P = 30$ mW, beam area = 0.116cm^2 , $T = 14$ s, fluency of $3,62\text{J}/\text{cm}^2$, $E = 0.42\text{J}$; power density = $0.26\text{mW}/\text{cm}^2$) was applied on 8 points for 7 consecutive days. This study showed that, considering pelvic immobilization in the experimental condition, LLLT can minimize the catabolism by promoting an increase of glycogen reserves in the involved muscles, improving the total protein/DNA ratio, reducing pro-inflammatory activity (IL-6 and TNF-

α) and increasing the anti-inflammatory activity (IL-10), especially when the LLLT was applied during the period of immobilization, providing that skeletal muscles maintain better metabolic and structural conditions even under disuse conditions. Finally, this work was successful in elucidating thiopental and tribromoethanol anesthetics as the ones that least interfere with glucose metabolism, so that this favored the development of an experimental model of disuse with marked muscular catabolism, which can be attenuated by means of photobiomodulation (830 nm).

Keywords: Muscle, pelvic immobilization, anesthesia, photobiomodulation, laser, rats

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ABI	Abdominal inferior
ABS	Abdominal superior
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADC	Adutor curto
ADH	Hormônio antidiurético
ADL	Adutor longo
ANILAB	Animais de Laboratório
ANOVA	Análise de variância
AsGaAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Controle
Ca²⁺	Cálcio
Cl⁻	Cloro
CPOF	Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBM	Fotobiomodulação
GL Max	Glúteo máximo
GL Med	Glúteo médio
GTT	Teste de tolerância a glicose
IA	Infra abdominal
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
ILP	Iliopsoas
IM	Intramuscular
IP	Imobilização pélvica
IP	Intraperitoneal
IR	Imobilizado por 7 dias e remobilizado por 7 dias
ITT	Teste de tolerância a insulina
J	Joule
J/Cm²	Joule por centímetro quadrado
K⁺	Potássio
KITT	Constante de decaimento da glicemia

KX	Ketamina-Xilasina
LAIP	Laser por 7 dias após o período de imobilização.
LDIP	Laser durante os 7 dias de imobilização pélvica
LIP	Laboratório Interdisciplinar
LLLT	Terapia Laser de Baixa intensidade (do inglês: <i>Low Level Laser Therapy</i>)
mg/kg	Miligramas por quilogramas
mm	Milímetro
mW	Miliwatt
n	Número amostral
Na⁺	Sódio
nm	Nanômetro
pg/mL	Picograma por mililitro
P	Potência
PT	Proteína Total
PV	Paravertebral
PVC	Policloreto de polivinila
RF	Reto femoral
RNA	Ácido ribonucléico
s	Segundos
SA	Supra abdominal
t	Tempo
T	Tiopental sódico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>Tumor necrosis factor-alfa</i>)
TRI	Tribromoetanol
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UNIMEP	Universidade Metodista de Piracicaba
Z	Zolazepan
λ	Lambda (comprimento de onda)
β	Beta
<	Menor que
>	Maior que
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

1. Estudo I.

Figura 1. Constante de decaimento de glicose (KITT; % min) de ratos submetidos à anestesia por: tiopental (T, 40mg/Kg); zolazepan (Z, 50mg/Kg); Ketamina-Xilazina (KX, 35 mg/kg peso e 4 mg/kg) e tribromoetanol (TRI, 250mg/Kg). Os valores correspondem à média \pm epm, n=5. $p<0,05^*$ se comparado ao T e $p<0,05^\#$ comparado ao Z.....45

2. Estudo II.

Figura 1. Representação gráfica do modelo proposto para imobilização pélvica aplicado em ratos de 3 meses. As medidas são dadas em milímetros (mm).....56

Figura 2. Dispositivo de imobilização pélvica em vista superior em projeto (A) e ajustado ao animal (C). Projeto do sistema de suspensão em vista perfil (B) e no mesmo plano (D) é possível observar o dispositivo ajustado ao animal.....57

Figura 3. Constante de decaimento de glicose (KITT; % min) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP) e remobilizado após 7 dias (RP7). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6 $p<0,05^*$ comparado ao C.....60

Figura 4. Razão proteína total/DNA (mg/100mg) dos músculos glúteo máximo (GL Max) e Iliopsoas (ILP) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP) e remobilizado pós 7 dias (RP7). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6, onde $*p<0,05$ comparado ao controle e $^\#p<0,05$ comparado ao IP.....61

Figura 5. Concentração sérica de interleucina 6 (IL6), interleucina 10 (IL10) e fator de necrose tumoral (TNF- α) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP)

e remobilizado após 7 dias (RP7). Os valores são expressos em pg/ml e correspondem à média \pm epm, n=6 p<0,05* comparado ao C.....62

3. Estudo III.

Figura 1. Modelo de imobilização pélvica em vista perfil (A) e vista superior (B).....74

Figura 2. Pontos de aplicação da terapia laser de baixa intensidade nos grupos LAIP (A) e LDIP (B)75

Figura 3. Relação proteína total/DNA dos músculos adutor curto (ADC) e glúteo máximo (GL Max) dos grupos Controle (C), Imobilização pélvica (IP), imobilizado por 7 dias e remobilizado por mais 7 dias (IR), Laser durante os 7 dias de imobilização pélvica (LDIP) e Laser por 7 dias após o período de imobilização (LAIP). Os valores correspondem a média \pm erro padrão da média p<0,05* diferente controle (C), p<0,05# diferente do IP, p<0,05[€] diferente do IR e p<0,05[¥] diferente do LDIP.....78

LISTA DE TABELAS

1. Estudo I.

Tabela 1. Valores de glicemia imediatamente a anestesia. Os valores estão expressos em média±epm, sendo $p<0,05^*$ comparado ao tiopental.....43

Tabela 2.Área sob a curva após o teste de tolerância a glicose (GTT, mg/dL/120 min) em ratos submetidos a quatro tipos de anestesia: tiopental (T, 40 mg/Kg); zolazepan (Z, 50 mg/Kg); ketamina-xilasina (KX, 35 mg/kg e 4 mg/kg); tribromoetanol (TRI, 250mg/Kg). Os valores correspondem à média ± epm, n=5. $p<0,05^*$ se comparado ao T e $p<0,05^\#$ comparado ao Z.....44

2. Estudo II.

Tabela 1. Percentual de redução da reserva energética (glicogênica) dos músculos envolvidos no processo de imobilização pélvica dos grupos IP e RP7 comparados ao controle ($p<0,05^*$) e percentual de aumento na comparação RP7 e IP ($p<0,05^\#$).....59

Tabela 2. Concentração de glicogênio (mg/100mg) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP) e remobilizado após 7 dias (RP7). Os valores correspondem a média ± epm, n=12, $p<0,05^*$ comparado ao controle e $p<0,05^\#$ comparado ao IP.....59

3. Estudo III

Tabela 1. Glicogênio muscular dos músculos glúteo máximo (GL Max), glúteo médio (GL Med), paravertebral (Pv), adutor curto (Adu C), adutor longo (Adu L), reto femoral (RF), iliopsoas (iIp), supra abdominal (SA) e infra abdominal (IA) dos grupos Controle (C), Imobilização pélvica (IP), imobilizado por 7 dias e remobilizado por mais 7 dias (IR), Laser durante os 7 dias de

imobilização pélvica (LDIP) e Laser por 7 dias após o período de imobilização (LAIP). Os valores correspondem a média±erro padrão da média p<0,05* diferente controle (C), p<0,05# diferente do IP e p<0,05[€] diferente do IR.....77

Tabela 2. Análises das citocinas interleucina – 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF – α) e interleucina – 10 (IL – 10) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP), imobilizado por 7 dias e remobilizado por mais 7 dias (IR), laser durante os 7 dias de imobilização pélvica (LDIP) e laser após os 7 dias de imobilização pélvica (LAIP). Os valores correspondem a média±erro padrão da média com significância de p<0,05* diferente do C, p<0,05# diferente do IP, p<0,05[€] diferente do IR e p<0,05[£] diferente do LDIP.....79

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
PRIMEIRA PARTE.....	22
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
1.1 HIPÓTESES	33
1.2 OBJETIVO GERAL.....	33
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
SEGUNDA PARTE	35
<i>2. Estudo – I: Alteração no metabolismo da glicose sob diferentes anestésicos: Estudo em ratos.....</i>	<i>36</i>
RESUMO.....	38
INTRODUÇÃO.....	40
METODOLOGIA.....	42
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
<i>3. Estudo – II: Proposta de um modelo não invasivo para imobilização pélvica: Estudo em ratos.....</i>	<i>51</i>
RESUMO.....	Erro! Indicador não definido.
INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
MATERIAIS E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
CONSIDERAÇÕES FINAIS	Erro! Indicador não definido.

REFERÊNCIAS**Erro! Indicador não definido.**

4. <i>Estudo – III: Influência da fotobiomodulação por terapia laser de baixa intensidade (830nm) no metabolismo muscular e concentrações de citocinas durante e após imobilização pélvica: Estudo em ratos.</i>	68
RESUMO.....	70
INTRODUÇÃO.....	72
METODOLOGIA.....	73
RESULTADOS	76
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
TERCEIRA PARTE	87
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	90
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	92
ANEXOS	
ANEXO A - CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO MANUSCRITO I	94
ANEXO B - CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO MANUSCRITO II	96
ANEXO C - CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO MANUSCRITO III.....	98
ANEXO D - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - <i>ESTUDO I</i>	100
ANEXO E - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - <i>ESTUDO II e III</i>	102
APÊNDICE - ESTUDOS TRADUZIDOS PARA A LINGUA INGLESA.....	104

PRIMEIRA PARTE

Contextualização

Referências Bibliográficas

Hipóteses

Objetivo Geral

Objetivos Específicos

1. Contextualização

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O tecido muscular configura-se como uma estrutura dinâmica, sendo que suas células multinucleadas podem alterar suas condições em função das exigências funcionais a que estão sujeitas. Essa propriedade pode ser denominada de plasticidade muscular, onde de um lado há diferentes estímulos resultando em alterações, entre as quais as anabólicas, compatíveis com o quadro de hipertrofia/hiperplasia, e de outro é possível ter a ausência de estímulos capaz de deflagrar alterações deletérias compatíveis com o quadro de atrofia (CAPITANIO et al., 2006; WIGGS, 2015).

É notório que nos últimos anos a atrofia do musculoesquelético tem sido alvo crescente de estudos, ao passo que pode estar associada a diversas causas como: o envelhecimento, a imobilização articular, bem como o repouso prolongado no leito (EDGERTON et al., 2002).

Nas últimas décadas o número de investigações sobre o tecido muscular tem aumentado, com destaque para o interesse no papel do suporte postural e da atividade neuromuscular na regulação das propriedades estruturais, funcionais, bioquímicas e moleculares concernentes a esse tecido (HADDAD et al., 2003).

Sabe-se que a funcionalidade do tecido musculoesquelético é dependente da inervação motora, carga mecânica, realização de ciclos de estiramentos/encurtamentos, bem como pela mobilidade articular. Com efeito, quando um destes fatores é comprometido, o quadro de atrofia muscular pode ser instalado de forma severa, de modo que determinadas situações podem culminar em danos irreversíveis, conforme observados em casos de desnervação ou lesão medular (BROOKS e MYBURGH, 2014; WALSH e VAN REMMEN, 2016).

Por sua vez, a atrofia muscular constitui um processo altamente ordenado e modulado por alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que resultam no prejuízo funcional dos músculos comprometidos (BODINE, 2013). Como parte da interface envolvida na plasticidade muscular, a atrofia configura-se como a expressão da deterioração que o tecido muscular sofre em condições de tensão e/ou de carga mecânica reduzida, de modo que essa é uma tentativa de manter o funcionamento adequado a demanda funcional (GALVAN et al., 2016).

No que se refere a atrofia muscular por desuso, a imobilização articular é uma condição amplamente usada na prática clínica, que tem por objetivo favorecer a

recuperação funcional por meio da restrição ao movimento de determinada estrutura ou segmento. Entretanto, essa estratégia terapêutica pode desencadear mecanismos catabólicos que podem ser reversíveis ou irreversíveis (WOLFE, 2006; WIGGS, 2015). É considerado que mesmo para situações reversíveis poderá haver sequelas, fato que reforça a necessidade de investigações que minimizem o risco dessa implicação.

Muito embora as pesquisas sobre atrofia muscular tenham avançado, chama a atenção o fato de que os mecanismos relacionados às alterações de ordem morfológicas, bioquímicas e funcionais induzidas pela atrofia muscular ainda não estão bem esclarecidos. Dessa forma, constata-se algumas hipóteses apresentadas na literatura, entre as quais destacam-se: alterações no *turnover* proteico, alterações no padrão de expressão das isoformas da miosina de cadeia pesada, redução do número de mionúcleos, bem como redução do domínio nuclear, além da ativação e inibição de vias metabólicas (ALLEN; ROY; EDGERTON, 1999; WU; KANDARIAN; JACKMAN, 2011; BODINE 2013).

No que se refere aos mecanismos pró e anti-inflamatórios ligados ao desuso muscular, citocinas como IL-6, IL-10 e TNF- α tem um importante papel na reversão/atenuação do catabolismo, uma vez que o tecido muscular é o maior órgão em extensão e a contração muscular atua na regulação da expressão do RNAm da IL-6, ao passo que essa miocina pode ativar mecanismos ligados a captação de glicose, oxidação de gorduras e ativação de células satélites. A IL-10 atua principalmente na regulação de outras citocinas, bem como na síntese de células endoteliais. Por sua vez, o TNF- α participa de mecanismos ligados a fisiopatologia da resistência à insulina, já que pode reduzir a translocação dos transportadores de glicose (GLUT-4), além de interferir na fosforilação do substrato 1 dos receptores de insulina (IRS-1) e fosforilação específica do receptor da insulina (KELLER et al., 2001; EVANS et al., 2014).

Considerando a relevância e implicação clínica que a resposta atrófica causa nos diferentes sistemas biológicos, são necessários esforços voltados para compreender os processos envolvidos na instalação e reversão da atrofia muscular por desuso. Nesse sentido, a literatura apresenta alguns modelos animais capazes de induzirem atrofia em caráter experimental, com destaque para os modelos de suspensão do membro posterior e microgravidade (CHOWDHURY et al., 2013; SHENKMAN, 2016), lesão nervosa (FERNANDES et al., 2005; SHEN et al., 2016) e imobilização articular (SILVA et al., 2006; PETRINI et al., 2016).

Com destaque para a experimentação animal, trata-se de uma modalidade que favorece o estudo de diferentes condições patológicas e não patológicas que seriam de difícil realização em humanos. Nesse contexto, a experimentação animal tem favorecido descobertas para prevenção, diagnóstico e tratamento das diferentes condições que podem afetar a saúde humana (SIMÕES; KULAY; BARACAT, 2011; DAMY et al., 2010).

Apesar da literatura apresentar diferentes métodos para estudo do desuso, destacando entre eles os modelos de imobilização articular, não se encontra nenhum estudo que tenha envolvido grandes grupos musculares de forma não invasiva, de modo que isso possivelmente seja semelhante a restrição ao leito. No aspecto experimental, muito embora a lesão medular seja um modelo de desuso que envolve grandes grupos musculares, trata-se de uma condição experimental de manuseio complexo, irreversível e pouco responsiva em termos de recuperação funcional (GREGORY et al., 2003).

Dentro do que a literatura apresenta em estudos sobre a atrofia muscular experimental por desuso, de modo geral esses modelos são caracterizados por considerável atrofia dos músculos extensores rápidos e lentos, seguida de transformação das fibras fenotipicamente lentas para rápidas (HADDAD et al., 2003). Frente ao desuso, nota-se ainda acentuado aumento do metabolismo glicolítico (RUDRAPPA et al., 2016), ao passo que a redução acentuada de proteína e de massa muscular que caracteriza a atrofia parece resultar de um importante desequilíbrio entre as vias de síntese e de degradação proteica (SULTAN; DITTRICH; PETTE, 2000).

Mediante o quadro de atrofia muscular há diferentes estratégias de intervenção, que basicamente buscam reestabelecer a homeostasia por meio da mobilidade (FOWLES et al., 2000; WIGGS, 2015). Nesse sentido, a fotobiomodulação (FBM) por meio da terapia laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy* – LLLT) configura-se como uma alternativa promissora na reversão ou atenuação do catabolismo muscular observado em casos de desuso que culminam em atrofia muscular, haja visto que se trata de uma intervenção passiva e não invasiva (NAKANO et al., 2009; SOUZA e SILVA, 2016).

Em outras situações já foi demonstrado que a FBM é capaz de ativar mecanismos de reversão e atenuação do catabolismo resultante de atividade física (FERRARESI et al., 2012) ou resultante de período prolongado de desuso (NAKANO et al., 2009). No entanto, a literatura é escassa em estudos que investiguem os efeitos da FBM durante ou após a instalação do quadro de atrofia muscular.

Dos poucos estudos encontrados sobre FBM e atrofia muscular, Nakano et al (2012) utilizaram LLLT (Ga–Al–As, 830 nm; 60 mW, energia = 10,8J/cm², tempo total

180 s) em um modelo de atrofia proveniente da contenção do membro posterior de ratos. Após o período de imobilização foi constatado aumento de células satélites e angiogênese. Já em células musculares distróficas, constatou-se que a FBM (Ga–Al–As, 830 nm, 30 mW, energia = 5J/cm²) mostrou-se eficaz na proliferação celular, redução do estresse oxidativo e redução do processo inflamatório *in vivo* e *in vitro* (MACEDO et al., 2015). Convém ressaltar que os estudos encontrados sobre FBM não apresentam detalhamento dos parâmetros utilizados.

Mais recentemente uma revisão sistemática apontou que no aspecto experimental para afecções locomotoras, os comprimentos de ondas mais utilizados têm sido 904 nm e 830 nm, de modo que as energias variam de 0,12J a 50J. Vale considerar que esses achados tiveram como foco a resposta inflamatória mediante FBM em lesões ortopédicas agudas (SOUZA e SILVA, 2016). Diante do exposto, presume-se que a atrofia do musculoesquelético pode desencadear mecanismos inflamatórios, razão pela qual podem ser responsivos a FBM. Vale ressaltar que estudos sobre FBM em músculos atrofiados são escassos e nada foi encontrado sobre uso da FBM durante a fase aguda do desuso.

É notório que muito têm sido feito no sentido de compreender os mecanismos ligados a atrofia muscular por desuso. Assim, de diferentes formas distintos grupos de pesquisa têm empenhado esforços em ampliar o conhecimento dessa temática.

Nesse sentido, a presente tese contribui com três estudos realizados de forma sequencial para apontar a opção anestésica que menos interfere no metabolismo da glicose, uma vez que o tecido muscular tem importante função metabólica, tendo a glicose como seu principal substrato energético (*estudo I*). Esse estudo possibilitou ainda avaliar outras opções anestésicas mais acessíveis e pouco utilizadas, ao passo que os dados obtidos desse estudo favoreceram na escolha do anestésico usado no manuseio experimental do ensaio de materiais e ajustes biomecânicos do dispositivo de imobilização pélvica do *estudo II*.

Uma vez estabelecido o modelo não invasivo de imobilização pélvica (*estudo II*) capaz de restringir grandes grupos musculares, o próximo passo foi usar a FBM para intervir no intuito de reverter/atenuar o catabolismo muscular que ocorreu durante e após o período de imobilização (*estudo III*).

O ponto em comum dos três estudos se dá em torno das respostas que o tecido muscular apresenta nas diferentes condições experimentais estudadas (anestesia, imobilização, imobilização e FBM). Assim, chama-se a atenção para o fato de que esse

tecido configura-se como o maior reservatório de proteína/aminoácido e glicose do corpo humano (BONALDO e SANDRI, 2013), fato esse que destaca sua grande função metabólica no controle glicêmico, com destaque para o armazenamento (gliconeogênese) e disponibilização de glicose (glicogenólise) para assegurar a homeostasia, seja em condições normais ou patológicas (RUDRAPPA et al., 2016).

No que se refere ao *estudo I*, para que seja possível intervir de forma mais controlada e segura em estudos experimentais, são necessários dados que subsidiem a escolha segura do anestésico, seja para procedimentos ou eutanásia. Assim, estudos apontam que o uso de anestesia em pequenos animais pode ser um desafio, ao passo em que variáveis como: tamanho, espécie, idade, *status* nutricional, temperatura corporal e ambiental, nível de estresse, hemodinâmica, metabolismo e outros fatores podem influenciar na resposta do organismo ao anestésico (SHARP et al., 2015).

O *estudo I* foi fundamental para esclarecer quais anestésicos não apresentam interferências importantes na dinâmica do metabolismo da glicose, que é um importante substrato energético para o tecido muscular. Com efeito, o *estudo I* favoreceu os ensaios de materiais, bem como os ajustes biomecânicos para desenvolvimento do dispositivo de imobilização pélvica do *estudo II*, que na fase de testes utilizou o anestésico com menor interferência metabólica.

Não se encontra na literatura um modelo bem estabelecido para estudo dos efeitos do desuso dos músculos que envolvem a cintura pélvica, nem tão pouco de grandes grupos musculares restringidos de forma não invasiva. Com efeito, inúmeras condições tais como: fraturas, tumores, fraqueza muscular, alterações da coluna vertebral, restrição ao leito, problemas vesicais e outras situações podem culminar em atrofia muscular por hipoatividade ou mesmo desuso. Um ponto a se considerar é que a cintura pélvica configura-se como uma complexa e importante estrutura ligada tanto a funções estáticas, quanto a funções dinâmicas no que concerne a vísceras, coluna e membros inferiores (HAUSHILD et al., 2008; BARBOSA et al., 2013).

No intuito de mimetizar os efeitos deletérios da atrofia muscular por desuso, a literatura refere modelos invasivos e não invasivos, os quais em sua maioria são desenvolvidos para o estudo da imobilização articular do membro posterior de ratos (YOSHIDA; MATSUZAKI; HOSO, 2016), além de modelos invasivos e não invasivos de indução de escoliose e restrição do tronco (STOKES; MCBRIDE; ARONSSON, 2008; SILVA et al., 2012; GUIRRO; ARRUDA; SILVA, 2014). No intuito de preencher a lacuna existente na literatura, o *estudo II* empenhou esforços para desenvolver um modelo

não invasivo de imobilização pélvica para estudo da resposta quimiometabólica frente ao desuso de grandes grupos musculares.

Por meio do *estudo II* foi possível estabelecer um modelo viável economicamente, além do possibilitar a expansão de futuros estudos utilizando-se de diferentes variáveis, como: idade, massa corporal e gênero do animal, tempo de aplicação, bem como análises mais primorosas.

Considerando os prejuízos funcionais que a atrofia por desuso pode instalar no tecido muscular, destaca-se que a atenção no processo de intervenção, deve ser atribuída não somente após o período de desuso, mas sim durante o período de limitação, para que assim sejam precocemente acionadas vias anabólicas e inibidas vias catabólicas (WIGGS, 2015). É nesse sentido que o *estudo III* foi desenvolvido utilizando a FBM por LLLT como estratégia de intervenção na fase aguda (durante 7 dias de imobilização) e na fase precoce (após 7 dias de imobilização e retirada do dispositivo). Convém ressaltar que o período de 7 dias já é bem estabelecido no que se refere à alterações importantes para o tecido muscular (SILVA et al., 2006).

Diante do desuso muscular experimental que envolve a musculatura pélvica, optou-se pelo comprimento de onda de 830 nm, que além de atingir tecidos mais profundos, tem sido utilizado em estudos focados no tecido muscular (Silva & Souza 2016). Por fim, os três estudos objetivaram preencher lacunas existentes sobre a opção anestésica, a criação de um modelo de imobilização pélvica e os efeitos da FBM durante e após quadro de atrofia muscular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

ALLEN, D.L.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. **Muscle Nerve**. v. 22, n. 10, p. 1350-1360, 1999.

BARBOSA, A.C. et al Manipulation and selective exercises decrease pelvic anteversion and low-back pain: A pilot study. **J Back Musculoskelet Rehabil**. v. 26, n. 1, p. 33-6, 2013.

BODINE S. C. Disuse-induced muscle wasting. **Int J Biochem Cell Biol**. V. 45, p. 2200-2208, 2013.

BROOKS, N. E.; MYBURGH K. H. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. **Front. Physiol**. v. 5, n. 99, 2014.

CAPITANIO, M. et al. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. **Proc Natl Acad Sci.USA**. v. 103, n. 1, p. 87-92, 2006.

CHOWDHURY, P. et al. Animal model of simulated microgravity: a comparative study of hindlimb unloading via tail versus pelvic suspension. **Physiol Rep**. v. 1, p. 1-11, 2013.

DAMY, S.B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Rev Assoc Med Bras**. v. 56, p. 103-111, 2010.

EDGERTON, V.R. et al. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. **Am J Phys Med Rehabil**. v. 81, n. 11, p. 127-147, 2002.

EVANS et al. TNF- α blockade induces IL-10 expression in human CD4⁺ T cells. **Nat Commun**.v.5, n. 3199, 2014.

FERNANDES, K.C. et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Rev Bras Fisiot**. v. 9, n. 2, p. 235-241, 2005.

FORESTO, C.S. et al. Morphological and molecular aspects of immobilization-induced muscle atrophy in rats at different stages of postnatal development: the role of autophagy. **J Appl Physiol (1985)**. v. 121, n. 3, p. 646-660, 2016.

FOWLES, J. R. et al. The effects of acute passive stretch on muscle protein synthesis in humans. **Can J Appl Physiol**. v. 25, n. 3, p. 165–180, 2000.

GALVAN, E. et al. Protecting Skeletal Muscle with Protein and Amino Acid during Periods of Disuse. **Nutrients**. v. 8, n. 7, 2016.

¹ Normatização com base na Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR 6023

GREGORY, C.M. et al. Human and rat skeletal muscle adaptations to spinal cord injury. **Can J Appl Physiol.** v. 28, n. 3, p. 491-500, 2003.

GUIRRO, R.R.J.; ARRUDA, E.J.; SILVA, C.A. Disuse induced by the spine rectification vest: experimental study. **Fisioter Pesqui.** v. 21, n. 1, 2014.

HADDAD, F. et al. Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. **J Appl Physiol.** v. 95, n. 2, p. 791-802, 2003.

MACEDO, A.B. et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. **PLoS ONE.** v. 10, p. 1-14, 2015.

KELLER C, STEENSBERG A, PILEGAARD H, OSADA T, SALTIN B, PEDERSEN BK, NEUFER PD. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **Faseb J.** v. 15, p. 2748-50, 2001.

PETRINI, A. C. et al. Prior swimming exercise favors muscle recovery in adult female rats after joint immobilization. **J Phys Ther Sci.** v. 28, n. 7, p. 2072–2077, 2016.

RUDRAPPA, S.S. et al. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. **Front Physiol.** v. 7, n. 361, 2016.

SHARP, P.S. et al. Comparison of stimulus-evoked cerebral hemodynamics in the awake mouse and under a novel anesthetic regime. **Sci Rep.** v. 5, n. 12621, 2015.

SHEN, Y. et al. Implantation of muscle satellite cells overexpressing myogenin improves denervated muscle atrophy in rats. **Braz J Med Biol Res.** v. 49, n. 2, 2016.

SHENKMAN B.S. et al. From Slow to Fast: Hypogravity-Induced Remodeling of Muscle Fiber Myosin Phenotype. **Acta Naturae.** v. 8, n. 4, p. 47-59, 2016.

SILVA, C.A. et al. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. **Braz J Med Biol Res.** v. 39, n. 18, p. 979-985, 2006.

SILVA, C.A. et al. Proposal of non-invasive experimental model to induce scoliosis in rats. **Rev Bras Fisioter.** v. 16, n. 3, p. 254-60, 2012.

SOUZA, M.V.; SILVA, M.O. Laser therapy on locomotor disorders: a systematic review of experimental studies. **Rev Bras Med Esporte.** v. 22, p. 76-82, 2016.

SIMÕES, R.S.; KULAY, L.J.R.; BARACAT, E.C. Importância da experimentação animal em ginecologia e obstetrícia. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v.33, p.119-22, 2011.

SULTAN, K.R.; DITTRICH, B.T.; PETTE, D. Calpain activity in fast, slow, transforming, and regenerating skeletal muscles of rat. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 279, n. 3, p. 639-647, 2000.

WALSH, M.E.; VAN REMMEN, H. Emerging roles for histone deacetylases in age-related muscle atrophy. **Nutr Healthy Aging**. v. 4, n. 1, p. 17-30, 2016.

WIGGS, M. P. Can endurance exercise preconditioning prevention disuse muscle atrophy? **Frontiers in Physiology**. v. 6, n. 63, 2015.

WOLFE, R.R. The underappreciated role of muscle in health and disease. **Am J Clin Nutr**. v. 84, n. 3, p. 475–482, 2006.

WU, C. L.; KANDARIAN, S.C.; JACKMAN, R.W. Identification of genes that elicit disuse muscle atrophy via the transcription factors p50 and bcl-3. **PloS ONE**. v. 6, n. 1, 2011.

YOSHIDA, S.; MATSUZAKI, T.; HOSO, M. An immunohistochemical study of the sciatic nerve in a rat knee immobilization model. **J Phys Ther Sci**. v. 28, n. 4, p. 1116-9, 2016.

1.1 HIPÓTESES

As hipóteses da presente tese são:

1. Os anestésicos utilizados em experimentação animal podem interferir em maior ou menor grau na captação de glicose pelo tecido muscular e também na secreção insulínica;
2. Um modelo não invasivo de imobilização pélvica pode ser efetivo em induzir atrofia do musculoesquelético;
3. A fotobiomodulação por meio da LLLT pode reverter ou minimizar o catabolismo causado pela contenção/restrrição da cintura pélvica em caráter experimental.

1.2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo de imobilização pélvica para ratos e estudar os efeitos quimim metabólicos da fotobiomodulação por laserterapia durante e após o período de imobilização.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Selecionar e determinar um anestésico cuja ação tenha menor interferência possível nas dinâmicas de secreção insulínica e captação de glicose;
- b. Considerar aspectos anátomo-funcionais do animal e desenvolver um modelo que seja eficaz em mimetizar as condições deletérias do desuso;
- c. Avaliar as reservas glicogênicas da musculatura pélvica;
- d. Avaliar a relação proteína total/DNA dos músculos com maior comprometimento das reservas glicogênicas;
- e. Avaliar os efeitos da imobilização pélvica sobre as citocinas plasmáticas (IL-6, IL-10 e TNF- α);

- f. Avaliar os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade no tecido muscular durante e após o período de imobilização pélvica.

SEGUNDA PARTE

Estudo I: Alteração no metabolismo da glicose sob diferentes anestésicos: Estudo em ratos.

ACEITO: “*Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*”, em 23 de Fevereiro de 2017, sob a referência nº - OACP_247_16

Estudo II: Proposta de um modelo não invasivo para imobilização pélvica: Estudo em ratos

Submetido: “*PM & R (PHILADELPHIA,2009): The Journal Of Injury, Function And Rehabilitation*”, em 05 de Novembro de 2016, sob a referência nº - PMRJOURNAL_2016_36

Estudo III: Influência da fotobiomodulação por terapia laser de baixa intensidade (830nm) no metabolismo muscular e concentrações de citocinas durante e após imobilização pélvica: Estudo em ratos.

Submetido: “*Experimental Physiology*”, em 20 de Janeiro de 2017, sob a referência nº - EP-RP-2017-086282.

2. *Estudo – I*

Alteração no metabolismo da glicose sob diferentes anestésicos: estudo em ratos.

Submetido: “*Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*”, em 05 de Agosto de 2016, sob a referência nº - OACP_247_16

ALTERAÇÃO NO METABOLISMO DA GLICOSE SOB DIFERENTES ANESTÉSICOS: ESTUDO EM RATOS

Eder João de Arruda^a, Carlos Alberto da Silva^b, Nivaldo Antonio Parizotto^c.

- a. Doutorando em Fisioterapia - UFSCar – ftederarruda@gmail.com
- b. Docente do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia – UNIMEP – casilva@unimep.br
- c. Docente do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia – UFSCar – nivaldoaparizotto@hotmail.com

ENDEREÇO

UNIMEP - Rodovia do Açúcar, km 156 (SP-308)

CEP. 13.423-170 - Piracicaba, SP - Brasil

UFSCar - Rodovia Washington Luis, Km 235 (SP 310). Jd Guanabara, São Carlos – SP. CEP 13.565-905 – Brasil.

METABOLISMO DA GLICOSE SOB DIFERENTES ANESTÉSICOS.

Autor correspondente

Eder João de Arruda

ftederarruda@gmail.com

UFSCar - Rodovia Whashington Luis, Km 235, sp 310, Jardim Guanabara, São Carlos – São Paulo, cep 13.565-905 – Brasil.

Resumo

Procedimentos de anestesia, sedação e eutanásia são fundamentais para a experimentação animal, assim investigações acerca de diferentes anestésicos podem favorecer a redução de possíveis interferências metabólicas nos resultados finais. O estudo objetivou evidenciar as influências no metabolismo da glicose, sob diferentes anestésicos. Foram utilizados 40 ratos *Wistar* (n=10), **idade** entre 3 a 4 meses, peso de 250±50g, foram divididos em quatro grupos. Os anestésicos utilizados foram: Tiopental sódico (T, 40 mg/kg peso), Zolazepan (Z, 50 mg/kg peso), Ketamina-Xilazina (KX, 35 mg/kg peso e 4 mg/kg peso) e Tribromoetanol (TRI, 250mg/kg peso). Para avaliação metabólica 5 animais de cada grupo foram submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT) e outros 5 ao teste de tolerância a insulina (ITT). As recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* foram seguidas. Foram aplicados os testes Shapiro-Wilk, análise de variância ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$. O GTT evidenciou que os anestésicos Z e a combinação KX proporcionaram aumento de 16% e 41,6% da área sob a curva comparado ao T. Não houve diferença entre T e TRI. No que se refere ao ITT, observou-se que os anestésicos Z e a combinação KX reduziram a captação de glicose em 27,2% e 41,8% respectivamente. Não observou-se alterações no grupo TRI comparado ao T. Conclui-se que os anestésicos Z e KX alteraram mecanismos envolvidos no controle glicêmico, e os anestésicos tiopental e tribromoetanol não interferiram nas dinâmicas de controle glicêmico.

Palavras-Chave: Anestesia, Ratos, Metabolismo, Glicemia.

Abstract

Anesthesia, sedation and euthanasia procedures are indispensable for experimental studies with animals, so that anesthetics investigations may favor the reduction of metabolic interferences in the final results. This study aimed to show the influences on glucose metabolism under four different anesthetics. Forty Wistar young male rats were used (*Ratus norvegicus* var, *Albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), aged 3-4 months and weighing 250 ± 50 g. Experimental groups (n = 10) were structured: sodium thiopental (T) 40 mg/kg; Zolazepan (Z) 50 mg/kg; ketamine-xylazine (KX) 35 mg/kg and 4 mg/kg tribromoethanol (TRI) 250mg/kg. Each group was subdivided into five animals underwent glucose tolerance test (GTT) and five underwent insulin tolerance test (ITT). For metabolic evaluation the animals were subjected to a glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT). The Guide's recommendations for the Care and Use of Laboratory Animals were followed. The Shapiro-Wilk tests were applied, ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$. The GTT showed that anesthetics Z and KX combination provided an increase of 16% and 41.6% of the area under the curve compared to the T. There was no difference between T and TRI. With regard to the ITT, it was noted that the anesthetic Z and KX combination reduced the collection of glucose by 27.2% and 41.8% respectively. There was no change in TRI group compared to the T. It is concluded that anesthetics Z and KX altered mechanisms involved in glycemic control. Thiopental anesthetic and tribromoethanol did not interfere in glycemic control dynamics.

Key words: anesthesia, rats, metabolism, glycemia.

INTRODUÇÃO

No intuito de favorecer a evolução humana, registros apontam que as primeiras incursões na pesquisa experimental se deram há aproximadamente quatro séculos. Embora muito tempo tenha se passado, cada vez mais se evidencia a relevância da experimentação animal na ciência biomédica. Em consonância com os aspectos bioéticos, destaca-se que estudos experimentais são fundamentais e em grande parte insubstituíveis pelo fato de mimetizar características biológicas elementares próximas da compatibilidade humana ^{1,2}

O aspecto bioético tem sido tema decisivo na estrutura metodológica dos estudos experimentais. Assim, o clássico estudo de Russel e Burch³ foi um dos primeiros que apresentou prerrogativas bioéticas dos três “R” (Reduction, Replacement e Refinement) na experimentação animal, com atenção para a necessidade em se buscar estratégias eficazes em: 1) reduzir o número de animais; 2) substituir animais por outros meios sempre que possível; 3) rigor na condução dos experimentos no sentido de evitar e/ou minimizar sofrimento e estresse dos animais envolvidos nos estudos. Convém ressaltar que é notório o refino do rigor metodológico e esforços dos cientistas em aprimorar as prerrogativas que dignifiquem homens e animais. ⁴

Em grande parte dos estudos desenvolvidos com animais utiliza-se anestesia/sedação para procedimentos ou eutanásia.⁴ Na intenção de minimizar interferências no metabolismo da glicose, a escolha do anestésico merece atenção pelo fato de que fatores como; tamanho, espécie, idade, status nutricional, temperatura corporal e ambiental, nível de estresse, hemodinâmica, metabolismo e outros fatores podem influenciar na resposta do organismo ao anestésico. ⁵⁻⁷

Muitas são as variáveis que influenciam na anestesia e a variedade de anestésicos disponíveis no mercado, inevitavelmente expõe os estudos a questionamentos metodológicos e bioéticos, ao passo que a escolha mais assertiva pode atenuar e/ou evitar alterações indesejadas causadas pela anestesia. Nesse contexto, é mais do que necessário que haja empenho da sociedade e comunidade científica na busca por estratégias mais dignas, seguras e com menor influência nos resultados finais da pesquisa experimental. ^{4,8}

Em geral, procedimentos de anestesia/sedação podem desencadear alterações indesejadas, com destaque para a hipotermia e alteração no metabolismo da glicose, ao passo que isso pode alterar os resultados finais dos estudos, além de expor os animais a

um risco aumentado de morte não intencional. A depressão direta do centro termorregulador pode ser ainda mais crítica quando acompanhada por alterações no metabolismo da glicose. Embora existam equipamentos de monitorização hemodinâmica, ventiladores mecânicos e outros recursos tecnológicos para reduzir a perda amostral, o alto custo inviabiliza a aquisição.^{5,9,10}

Um status anestésico pode indiretamente promover um estado hipercatabólico, com elevadas concentrações plasmáticas de hormônios com atividade catabólica como o cortisol, glucagon, catecolaminas, além de liberação de hormônios tróficos pelo hipotálamo, os quais estimulam a liberação pela hipófise de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio do crescimento, prolactina, endorfinas e hormônio antidiurético (ADH). Conseqüentemente há diminuição ou liberação alterada dos hormônios anabólicos, insulina e testosterona.¹¹

Tanto no âmbito clínico quanto no experimental, há décadas cientistas tem se empenhado na investigação de estratégias anestésicas que apresentem menor interferência possível no metabolismo da glicose, que por sua vez, em diferentes condições de anestesia pode desencadear quadros de intolerância à glicose e/ou resistência insulínica, além de provocar outras alterações catabólicas de fundo endócrino, como o aumento de cortisol e epinefrina. É de ressaltar que a existência de desordens endócrinas eleva consideravelmente os riscos da intervenção.^{9,12,13}

Diferentes parâmetros como pressão sanguínea, temperatura, ultrassom cardíaco, oxigenação, eletrocardiografia e outros, são apresentados como forma de monitoramento dos animais em anestesia.⁴ No entanto, são necessários estudos que se atentem ao metabolismo energético, visto que alterações no perfil glicêmico ocorrem com maior frequência e em geral podem ser incompatíveis com a vida, fato esse que pode resultar em morte não intencional dos animais em condição de experimentação.¹⁴

Faz-se necessário a busca por parâmetros que melhorem o controle experimental, além do que isso favorece a confiabilidade dos resultados experimentais. Nesse interim, os fármacos tiopental sódico, ketamina-xilazina, zolazepan e tribromoetanol são amplamente utilizados para anestesia, sedação e eutanásia em estudos publicados em revistas de grande fator de impacto.⁴

No intuito de elucidar possíveis influencias anestésicas no metabolismo da glicose, o presente estudo teve como objetivo avaliar a tolerância à glicose, bem como a tolerância a insulina de ratos submetidos a quatro diferentes anestésias.

METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UNIMEP sob protocolo 09/2014 e seguiu rigorosamente os princípios éticos e laboratoriais estabelecidos na oitava edição do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011).

Fizeram parte do estudo 40 ratos machos jovens da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com idade de 3 a 4 meses e massa corpórea de 250 ± 50 g. Os grupos experimentais (n=10) foram estruturados em; Tiopental sódico (T) 40 mg/kg (do laboratório CRISTÁLIA), Zolazepan (Z) 50 mg/kg (do laboratório VIRBAC), Ketamina-Xilazina (KX) 35 mg/kg e 4 mg/kg (ambos do laboratório BAYER) e Tribromoetanol 250mg/kg (do laboratório SIGMA). Cada grupo foi subdividido em cinco animais submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT) e outros cinco submetidos ao teste de tolerância a insulina (ITT).

Mediante divisão dos grupos experimentais, seguiu-se recomendações para que fosse respeitado um período de 48 horas, período esse que teve a finalidade de minimizar possíveis alterações ansiolíticas e comportamentais nos animais.⁶

Para o procedimento de anestesia utilizou-se as vias intraperitoneal (ip) ou intramuscular (im), conforme recomendam os laboratórios fabricantes de cada anestésico. Na via ip o anestésico foi injetado meio centímetro à esquerda da linha alba. Pela via im, a substância foi injetada na região lateral do membro posterior direito. Tanto para a via ip quanto para im utilizou-se agulha hipodérmica 25G 1” 25 x 5.

Teste de tolerância à insulina (ITT)

Para a realização do ITT, os ratos foram anestesiados e após 10 minutos da indução anestésica, foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste, determinando assim o tempo zero. Sequencialmente a administração de insulina (2 U/Kg/ip - Biohulin) realizou-se a coleta de sangue nos tempos 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min e a glicemia novamente avaliada.¹⁵

Teste de tolerância à glicose (GTT)

Para avaliação do GTT, os animais foram anestesiados e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada para glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado glicose (2 g/Kg/ip) diluída em soro fisiológico, seguido

de coleta de sangue nos tempos 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min e a glicemia novamente avaliada. Como o tempo de análise é pre-estabelecido em 120 min, os resultados apresentam a quantidade de glicose mobilizada nesse período.¹⁵

No que se refere ao procedimento de coleta de sangue nos diferentes tempos, tanto no GTT quanto no ITT os animais estavam sob efeito do anestésico, de modo que 30 segundos antes do tempo regulamentar da coleta, uma alíquota de sangue era dispensada e somente a compressão da cauda era suficiente para provocar o sangramento.

Convém ressaltar que mediante aplicação do anestésico respeitou-se o tempo de 10 minutos para que houvesse supressão das respostas centrais e consequente anestesia. Esse tempo de espera antes de iniciar procedimentos invasivos em animais de experimentação tem sido consensual em publicações de impacto.⁴

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido da aplicação da análise de variância ANOVA (One-Way) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A constante de decaimento (kITT) foi calculada através do software ORIGIN® (versão 5.0).

RESULTADOS

Inicialmente avaliou-se a glicose basal previamente a anestesia, de modo que não houve diferença entre os grupos (tabela 1). No entanto, sob a ação dos diferentes anestésicos utilizados em experimentação animal, nota-se no perfil glicêmico que os anestésicos tiopental (T) e zolazepan (Z) apresentaram valores considerados ideais. Por outro lado, após a anestesia, os grupos submetidos à anestesia por Ketamina/Xilazina (KX) e tribromoetanol (TRI) apresentaram elevação de 26% e 16% respectivamente comparados ($p < 0,05^*$) ao valor basal. Essa mesma condição se manteve quando esses grupos foram comparados ao T sob anestesia ($p < 0,05^{\#}$), conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Valores de glicemia basal e imediatamente após anestesia. Os valores estão expressos em média±epm, sendo $p<0,05^*$ comparado ao valor basal e $p<0,05^\#$ comparado ao tiopental sob anestesia.

Anestésico	Glicemia basal antes da anestesia mg/dL	Glicemia basal após anestesia mg/dL
Tiopental	90,3±4	94,5±5
Zolazepan	92,4±3	95,2±3
Ketamina/Xilazina	94,3±6 [#]	126,5±7 [*]
Tribromoetanol	94,6±3 [#]	112,2±2 [*]

Em seguida os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose, que foi realizado sob ação dos diferentes anestésicos, conforme observado na tabela 2. Como indicativo de redução na atividade secretória de insulina, constatou-se que o fármaco zolazepan apresentou aumento da área sob a curva em 16% comparado ao T. De forma mais severa a combinação ketamina/xilazina apresentou aumento da área sob a curva em 41,6% e 17% comparados ao T e Z respectivamente, fato esse indicativo de redução na responsividade das células β pancreáticas a glicose. Nota-se que o anestésico tribromoetanol não diferiu do tiopental, porém esses dois também se mostraram alterados em menor severidade, conforme tabela 2.

Tabela 2: Área sob a curva após o teste de tolerância a glicose (GTT, mg/dL/120 min) em ratos submetidos a quatro tipos de anestesia: tiopental (T, 40 mg/Kg); zolazepan (Z, 50 mg/Kg); ketamina-xilazina (KX, 35 mg/kg e 4 mg/kg); tribromoetanol (TRI, 250mg/Kg). Os valores correspondem à média ± epm, n=5. $p<0,05^*$ se comparado ao T e $p<0,05^\#$ comparado ao Z.

Anestésico	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	média±epm
Tiopental - mg/dl	600	620	590	610	620	608±10
Zolazepan - mg/dl	700	730	670	730	700	706±19 [*]
Ketamina/Xilazina - mg/dl	850	900	800	850	830	846±25 ^{*.#}
Tribromoetanol - mg/dl	650	710	610	660	630	648±31

No intuito de identificar a responsividade dos tecidos periféricos, realizou-se o teste de tolerância à insulina, que expressa resultados em constante de decaimento. O conjunto de dados evidenciou que os anestésicos T (5.6±0.21) e TRI (6.1±0.23) não

promoveram alterações importantes na sensibilidade insulínica dos tecidos periféricos. Por outro lado, a constante de decaimento do anestésico Z (3.9 ± 0.24) apresentou retardo de 27,2% comparada ao T ($p < 0.05^*$). De forma mais severa, a constante de decaimento da combinação KX (3.1 ± 0.23) apresentou 41,8% de redução comparada ao T e 20% comparada ao Z, conforme pode ser observado na figura 1.

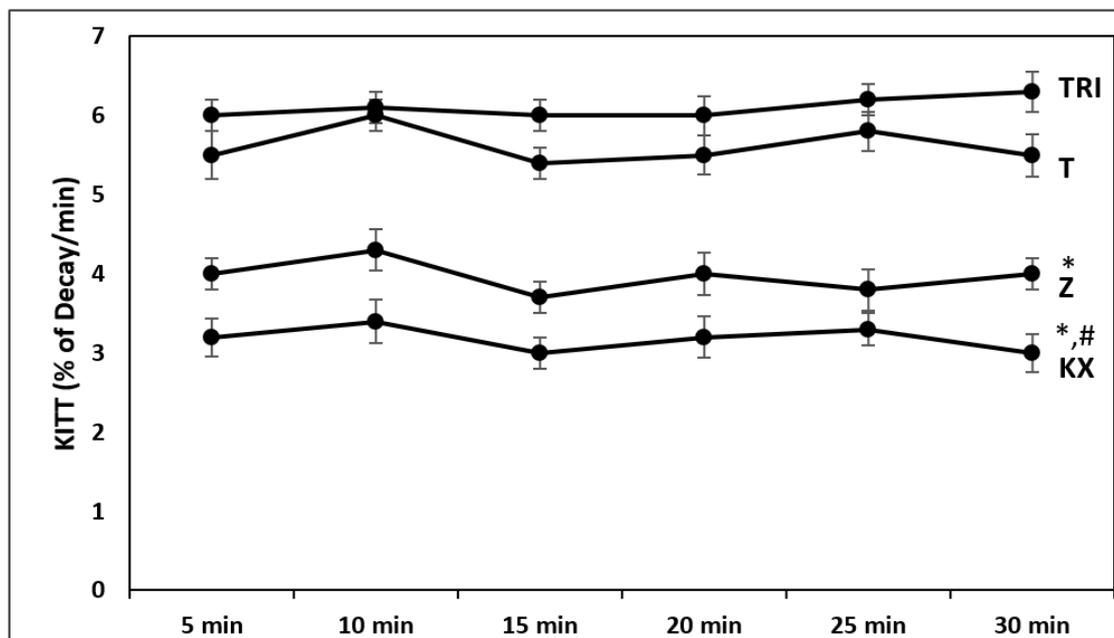


Figura 1. Constante de decaimento de glicose (kITT; % min) de ratos submetidos à anestesia por: tiopental (T, 40mg/Kg); zolazepan (Z, 50mg/Kg); Ketamina-Xilazina (KX, 35 mg/kg peso e 4 mg/kg) e tribromoetanol (TRI, 250mg/Kg). Os valores correspondem à média \pm epm, $n=5$. $p < 0,05^*$ se comparado ao T e $p < 0,05^\#$ comparado ao Z.

DISCUSSÃO

Avaliações de cunho metabólico devem estar vinculadas a constante busca de aprimoramento de parâmetros que possam indiretamente alterar as condições e dinâmicas de equilíbrio funcional. O presente estudo teve como eixo norteador a análise da responsividade insulínica de tecidos periféricos, bem como o processo secretório da insulina.

Nota-se que a variedade de opções anestésicas disponíveis e utilizadas em estudos experimentais tem sido ampla. Destaca-se que a finalidade do uso tem sido em procedimentos de anestesia/sedação ou eutanásia. Nesse sentido, uma revisão sistemática evidenciou que estudos publicados em revistas relevantes apresentam notificações insuficientes sobre procedimentos de anestesia/sedação e eutanásia, ao passo que isso

pode resultar em variações importantes em resultados provenientes de mesma metodologia. O estudo ainda chama atenção para esforços de normatização para fins de comparações.⁴

A sensibilidade dos tecidos alvo à insulina decorre de um controle refinado das concentrações plasmáticas dos principais substratos energéticos. Neste contexto, sabe-se que as células β pancreáticas ajustam a dinâmica secretória de insulina de acordo com a concentração de substrato circulantes.⁹

O teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado para avaliar o comportamento secretório da célula β pancreática, elucidou que a resposta quimiometabólica predominante na presença de diferentes anestésicos apontou aumento da área sob a curva do zolazepan comparados ao tiopental e tribromoetanol. Notou-se aumento ainda mais expressivo para a combinação ketamina-xilazina. Esses resultados merecem atenção por indicarem comprometimento na ativação das células beta (β) pancreáticas, que frente à sobrecarga de glicose não responderam de forma eficaz, o que sugere interferência dos fármacos no equilíbrio funcional das células β . Os fármacos tiopental e tribromoetanol mostraram-se alterados em menor severidade no que se refere a função pancreática.

Sabe-se que dentro das ações farmacológicas do zolazepan, destaca-se a estimulação de receptores α -2 adrenérgicos localizados nas células beta do pâncreas, os quais inibem a secreção de insulina.^{16,17} Embora a ação desta molécula ocorra em menor intensidade se comparado à observada na presença da combinação ketamina-xilazina, possivelmente haja graus diferentes de sensibilidade dos receptores α -2 adrenérgicos a moléculas utilizadas na anestesia.

No que se refere ao tiopental, sabe-se que este barbitúrico tanto bloqueia os canais de K^+ modulados pela relação ATP/ADP, quanto eleva a atividade das vias mobilizadoras de cálcio no citosol ligadas ao inositol trifosfato, despolarizando a célula β e potencializando o processo secretório de insulina^{18, 19}. Neste padrão de análise, foi verificado que na presença do tiopental a responsividade das células β ao bolus de glicose seguiu perfil similar ao descrito por outros autores, de modo que os valores do presente estudo corroboram com valores considerados padrão para a espécie.²⁰

Um estudo demonstrou que o tiopental tem influência direta na despolarização da membrana das ilhotas pancreáticas. Esse exposto sugere que ocorre estimulação da secreção insulínica, independente da presença de glicose sanguínea, uma vez que a estrutura molecular do anestésico tem similaridades com o ATP.²¹ Essa similaridade com

o ATP possivelmente mimetiza a manutenção de substrato energético, que por sua vez pode reduzir instabilidades metabólicas.¹⁰

Tem sido descrito que a Ketamina utilizada isolada, ou seja, sem estar associada a outro fármaco não altera as concentrações plasmáticas de insulina ou glicose. Estudos apontam que esse fármaco não promove relaxamento muscular, razão pela qual, há tempos, é geralmente utilizado em combinação com outros agentes farmacológicos.²²

Dentre as combinações presentes nos coquetéis aplicados em anestesia tem-se a associação da xilazina e ketamina, combinação essa que induz relaxamento muscular e analgesia. Destaca-se que a xilazina é um fármaco que promove alteração no metabolismo dos carboidratos e redução da insulinemia, fatores importantes a se considerar na experimentação²³. Este dado reitera as alterações na sensibilidade periférica á insulina, representado por redução no índice de captação periférica de glicose nos animais sob anestesia com o conjunto de fármacos.

Convém ressaltar que a xilazina é um agonista α adrenérgico que estimula receptores $\alpha 2$ nas ilhotas pancreáticas reduzindo o processo secretório da insulina, fato representado neste trabalho pela maior área sobre a curva no teste de tolerância a glicose frente à anestesia com estes fármacos associados.

No intuito de elucidar o comportamento acerca da responsividade dos tecidos periféricos, realizou-se o teste de tolerância a insulina, que evidenciou homeostase na dinâmica insulínica mediante ação anestésica do tiopental e tribromoetanol. Evidenciou-se ainda considerável redução na constante de decaimento da glicemia sob anestesia com zolazepan e a combinação ketamina-xilazina, fato indicativo de que esses fármacos comprometem a sensibilidade insulínica dos tecidos periféricos.

Com base no exposto supracitado, é sugestivo que existe um comprometimento no sistema de captação da hexose, fato esse que corrobora com outros resultados,²⁴ onde foi descrito que a combinação anestésica ketamina-xilazina enfraquece a responsividade secretória da insulina frente ao seu papel fundamental no controle glicêmico. O estudo ainda destaca que esta opção anestésica deve ser selecionada somente se não interferir no perfil de análise experimental.

Os dados apresentados no presente estudo sugerem que os fármacos tiopental e tribromoetanol são os que interferem em menor intensidade no metabolismo da glicose, conforme evidenciado na análise da área sob a curva do GTT. Em relação ao percentual da constante de decaimento (kITT), é sugestivo que não houve comprometimento das vias sinalizadoras da insulina. Convém ressaltar que a metodologia adotada no presente estudo

é simples, mas abre novas perspectivas para estudos mais primorosos para minimizar as possíveis interferências causadas pelo anestésico utilizado.

Muito embora o presente estudo tenha evidenciado alterações importantes no metabolismo da glicose, não houve morte não intencional dos animais, haja vista que foram seguidas rigorosamente as recomendações do guia de cuidados para animais de laboratório, bem como as recomendações de dosagens dos laboratórios dos fármacos utilizados no presente estudo.

Considerando que os mecanismos de sinalização insulínica são fundamentais para a compreensão do metabolismo da glicose²⁵, seria interessante que outros estudos se dedicassem a essa vertente de investigação com base nos procedimentos de anestesia utilizados na prática da experimentação animal e sua possível influência nos resultados finais. Em menor complexidade, dados relativos a temperatura dos animais durante o tempo de anestesia, tempo em que os animais permanecem sob anestesia no que se refere a dose/efeito, também seriam achados importantes de serem apresentados.

CONCLUSÃO

Ao se tratar de possíveis interferências metabólicas, os anestésicos tiopental e tribromoetanol não apresentaram interferências importantes na dinâmica de captação de glicose, conforme observado no ITT. No entanto, o GTT indicou alteração na secreção insulínica, que se manifestou em menor severidade mediante os anestésicos T e TRI. Assim, os anestésicos zolazepan e a combinação ketamina-xilazina merecem atenção devido às alterações observadas tanto a nível de captação de glicose, quanto a nível de secreção insulínica. Esses achados chamam a atenção para a escolha do anestésico, com destaque para estudos que se pautem no tecido musculoesquelético, que participa diretamente do metabolismo dos carboidratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matfield M. The ethics of animal research. *Exp Anim* 1996; 45(3):209-15.
2. Silva CA, Souza MZ, Luciano E, Arruda EJ, Grassi DO. Utilization of neuromuscular electric stimulation in the acute phase of ankle immobilization at 90°: Study in rats. *Journal of Chinese clinical medicine* 2009; 4: 249-257.
3. Russel WMS, Burch RL, editores. *The principle of human experimental technique*. London: Methuenl, 1959.
4. Uhlig C, Krause H, Koch T, Gama de Abreu M, Spieth PM. Anesthesia and Monitoring in Small Laboratory Mammals Used in Anesthesiology, Respiratory and Critical Care Research: A Systematic Review on the Current Reporting in Top-10 Impact Factor Ranked Journals. *Plos one* 2015; 10(8).
5. Yatabe T, Kawano T, Yamashita K, Yokoyama M. Preoperative carbohydrate-rich beverage reduces hypothermia during general anesthesia in rats. *J Anesth* 2011; 25: 558–562.
6. Arruda EJ, Kitamura JH, Chaves TP, Silva CA, Mascarim, AL. Comportamento Exploratório e Ansiolítico de Ratos e Ratas Submetidos à Estimulação Somatossensorial. *Rev Bras Terap e Saúde* 2011; 2(1):7-12.
7. Sharp PS, Shaw K, Boorman L, Harris S, Kennerley AJ, Azzouz M, Berwick J. Comparison of stimulus-evoked cerebral hemodynamics in the awake mouse and under a novel anesthetic regime. *Sci Rep* 2015; 5:12621.
8. Bara M, Joffe AR. The ethical dimension in published animal research in critical care: The public face of science. *Crit Care* 2014; 18: R15.
9. Silva CA, Guirro RRJ, Forti F. Tiopental Bloqueia os Canais de K⁺ ATP nas Célulasβ Pancreáticas. *Rev. Ciênc. Méd* 2005; 14(1): 33-42.
10. Boyko M, Kuts R, Gruenbaum BF, et al. The role of hypothermia in the regulation of blood glutamate levels in naive rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2013; 25: 174–183.
11. Cheibub ZB. Endocrine responses to anesthesia. *Rev Bras de Anesthesiol* 1991; 41(5): 357-363.
12. Diltser M, Camu F. Glucose homeostasis and insulin secretion during isoflurane anesthesia in humans. *Anesthesiology* 1988; 68: 880-886.
13. Maciel RT, Fernandes FC, Pereira LS. Anesthesia in a patient with multiple endocrine abnormalities: case report. *Rev. Bras. Anesthesiol* 2008; 58(2): 172-178.
14. Zuurbier CJ, Keijzers PJ, Koeman A, Van Wezel HB, Hollmann MW. Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats. *AnesthAnalg.* 2008; 106(1): 135-42;

15. Rafacho A, Roma LP, Tabaga SR, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 536-45.
16. Schossler JE, Schossler DR. Avaliação clínica da anestesia geral pela tiletamina-zolazepam associada ao fentanil em ratos. *Acta Cir Bras* 1993; 8(1): 32-4.
17. Polydoro AS, Natalini CC, Wallau JEW, Hennemann CRA, Cassol DS, Futema F. Cardiopulmonary alterations with romifidine, tiletamine/zalazepam and halothane in horses. *Cienc. Rural* 1997; 27 (2): 249 - 257.
18. Drews G, Krippeit-drews P, Düfer M. Electrophysiology of islet cells. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 654: 115-63.
19. Qiang DH, Xu YF, Sun JP, et al. Thiopental-induced insulin secretion via activation of IP3-sensitive calcium stores in rat pancreatic beta cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 30: 2112 – 2115.
20. Lindborg KA, Stephan jacob S, Henriksen EJ. Effects of Chronic Antagonism of Endocannabinoid-1 Receptors on Glucose Tolerance and Insulin Action in Skeletal Muscles of Lean and Obese Zucker Rats. *Cardiorenal Med* 2011; 1(1): 31–44.
21. Silva CA, Guirro RRJ, Forti F. Tiopental Bloqueia os Canais de K⁺ ATP nas Células β Pancreáticas. *Rev. Ciênc. Méd* 2005; 14(1): 33-42.
22. Norton WB, Scavizzi F, Smith CN, Dong W, Raspa M, Parker-Thornburg JV. Refinements for embryo implantation surgery in the mouse: comparison of injectable and inhalant anesthetics - tribromoethanol, ketamine and isoflurane - on pregnancy and pup survival. *Lab Anim.* 2015; 12.
23. Beckman B. Anesthesia and pain management for small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013; 43: 669–688.
24. Kobayashi H, Kato H, Hirabayashi Y, Murakami H, Suzuki H. Modulations of Muscle Protein Metabolism by Branched-Chain Amino Acids in Normal and Muscle-Atrophying Rats. *J. Nutr* 2006; 136: 234S-236S.
25. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2014; 6 (1), 1-23.

3. Estudo – II

Proposta de um modelo não invasivo para imobilização pélvica: Estudo em ratos

Submetido: “*PM & R (PHILADELPHIA,2009): The Jornal Of Injury, Function And Rehabilitation*”, em 05 de Novembro de 2016, sob a referência nº -
PMRJOURNAL_2016_36

PROPOSTA DE UM MODELO NÃO INVASIVO PARA IMOBILIZAÇÃO PÉLVICA: ESTUDO EM RATOS

Eder João de Arruda¹, Carlos Alberto da Silva², Rafaela Ferreira³, Nivaldo Antonio Parizotto⁴.

- 1- Doutorando pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
- 2- Professor do Programa de Pós Graduação em Ciências do Movimento – UNIMEP
- 3- Mestre em Fisioterapia – UNIMEP
- 4- Professor do Programa de Pós Graduação em Fisioterapia – UFSCar

Autor Correspondente:

Eder João de Arruda

ftederarruda@gmail.com

UFSCar - Rodovia Whashington Luis, Km 235, sp 310, Jardim Guanabara, São Carlos – São Paulo, cep 13.565-905 – Brasil.

Resumo

A cintura pélvica é uma estrutura de grande relevância para a locomoção. Intervenções que requeiram a imobilização pélvica merecem atenção pelo comprometimento funcional resultante. Assim, o estudo objetivou apresentar um dispositivo de imobilização pélvica para ratos e avaliar as alterações metabólicas da musculatura envolvida. Foram utilizados 18 ratos *Wistar*, idade entre 3 a 4 meses, massa corporal de 250 ± 50 g que posteriormente foram distribuídos em três grupos (n=6): controle (C), imobilização pélvica por 7 dias (IP) e remobilizado por 7 dias após 7 dias de uso do dispositivo (RP7). Realizou-se análises quanto a atividade metabólica do musculoesquelético nas diferentes condições experimentais. Os dados foram processados com os testes de Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA e teste de Tukey ($p<0,05$ para todos os testes). As reservas glicogênicas mostraram-se reduzidas em média 68% no grupo IP e 50% no grupo RP7. A constante de decaimento (KITT) revelou retardo de 10% na captação de glicose pelo tecido muscular do grupo IP. A razão proteína total/DNA mostrou que houve redução de 28 e 24% no glúteo máximo e 32 e 16% no iliopsoas dos grupos IP e RP7, respectivamente. Constatou-se aumento de citocinas IL-6 e 10 nos grupos IP e RP7, sendo que somente o grupo IP apresentou aumento de TNF- α . Portanto, o modelo mostrou-se eficaz em induzir o desuso da musculatura envolvida.

Palavras-Chave: Modelo não-invasivo, pelve, ratos, imobilização, músculos.

Abstract

The pelvic waist is a structure that holds great importance for locomotion. Interventions requiring pelvic immobilization deserve attention by the resulting functional loss. Thus, the study aimed to present a pelvic immobilization device for rats and evaluate the chemo-metabolic alterations on the pelvic musculature in question. Eighteen rats were divided into three groups (n = 6): control (C), pelvic immobilization for 7 days (IP) and remobilized for 7 days after 7 days of device use (RP7). Then analysis chemo-metabolic in pelvic muscles involved were done. The data were processed with the Kolmogorov-Smirnov test followed by ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$ for all tests). The glycogen reserves reduced on average 68% in the IP group and 50% in the RP7 group. The glucose decay constant (KITT) had a delay of 10% in the IP group. The ratio of total protein / DNA showed that there was a reduction of 28 and 24% in the gluteo maximus and 32 and 16% in the iliopsoas from the IP and RP7 groups, respectively. It found an increase of cytokines (IL-6 and 10) in the IP and RP7 groups, and only the IP group showed an increased of TNF- α . So the model was effective in inducing the disuse of the muscles in question.

Key words: non-invasive model, pelvis, rats, immobilization, muscles.

Introdução

A pelve configura-se como uma estrutura osteomioarticular de grande relevância para locomoção, sustentação de órgãos, termorregulação e outras funções ligadas ao sistema nervoso central.¹

Com destaque para a locomoção, a pelve é uma estrutura fundamental de ligação com a coluna vertebral e membros inferiores, sendo que para o desempenho motor dessas estruturas é necessário equilíbrio, suporte e coordenação, de modo que qualquer alteração funcional na pelve pode resultar em prejuízo funcional sistêmico.^{2,3}

Dados recentes apontam que lesões do anel pélvico estão associadas a uma elevada taxa de morbidade, que resulta em complicações de curto prazo e isso pode envolver elevados custos no processo de recuperação funcional. Constatam-se ainda que a incidência de fratura pélvica nos grandes centros urbanos é de aproximadamente 23 para cada 100.000 habitantes e a mortalidade geral varia de 4 a 23% entre localidades.^{4,5}

Por se tratar de uma estrutura anatômica que subsidia a mobilidade do tronco e membros inferiores, rotineiramente lesões do anel pélvico requerem imobilização, que em geral é utilizada da fase aguda à fase ambulatorial do tratamento⁶. Nesse sentido, a imobilização enquanto recurso terapêutico pode desencadear atrofia por desuso muscular, o que decorre de uma complexa interação de mecanismos que culminam com o catabolismo muscular.^{7,8}

No que se refere a dispositivos de imobilização para estudo do desuso muscular, a literatura apresenta modelos invasivos e não invasivos, os quais em sua maioria são desenvolvidos para o estudo da imobilização articular do membro posterior de ratos^{9,10,11,12} e modelos invasivos e não invasivos de indução de escoliose e restrição do tronco.^{13,14,15}

Devido à ausência na literatura de um modelo experimental para imobilização e a considerável problemática resultante do acometimento dessa estrutura, o presente estudo objetivou desenvolver um modelo de imobilização pélvica para ratos e avaliar as alterações metabólicas da musculatura pélvica envolvida.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) sob protocolo nº 05/2014 (anexo E).

Seguiu-se ainda os princípios éticos estabelecidos no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011).¹⁶

Para o procedimento experimental utilizou-se 18 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus* var, *albinus*, *Rodentia*, *Mamalia*), idade de 3 meses e massa corporal 250 ± 20 g. Os animais foram distribuídos em três grupos (n=6) a saber; controle (C), imobilização pélvica por 7 dias (IP) e o grupo remobilizado (RP7), que passou 7 dias sem o dispositivo, após os 7 dias de imobilização.

Modelo de imobilização

Para desenvolver o modelo de imobilização pélvica, o presente estudo baseou-se no trabalho de Silva et al.¹⁴, o qual apresenta um dispositivo constituído por coletes de policloreto de polivinila (PVC), eficaz para indução de escoliose em ratos. Assim, foram utilizados coletes (escapular e pélvico) de indução de escoliose, acompanhados da estrutura de suspensão, a qual foi desenvolvida com tubo acrílico, rodas de plástico, arame fino, parafuso em barra e roscas. Na figura 1 observa-se a representação esquemática do modelo desenhado no software Blueprint ®.

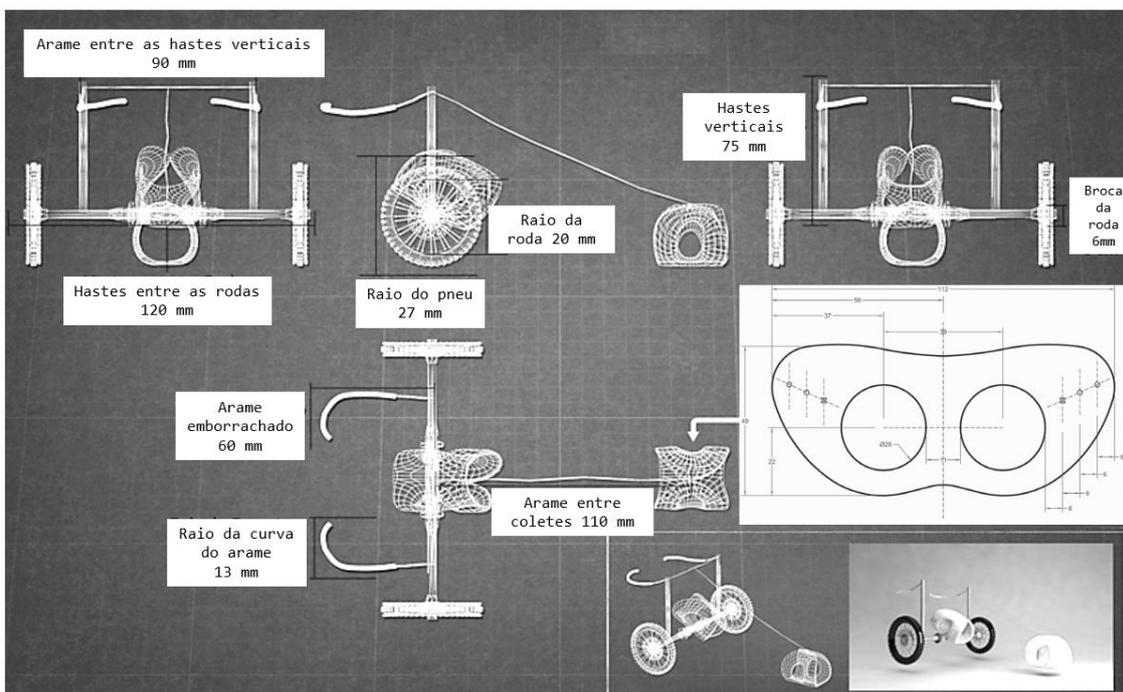


Figura 1: Representação gráfica do modelo proposto para imobilização pélvica aplicado em ratos de 3 meses. As medidas são dadas em milímetros (mm).

O modelo proposto para imobilização pélvica consiste em um sistema de suspensão da cintura posterior (pélvica) e patas posteriores (figura 2, A e C) de modo

que a as rodas (figura 2, B) favorecem a mobilidade, ao mesmo tempo em que restringe a ação da musculatura envolvida (figura 2D).

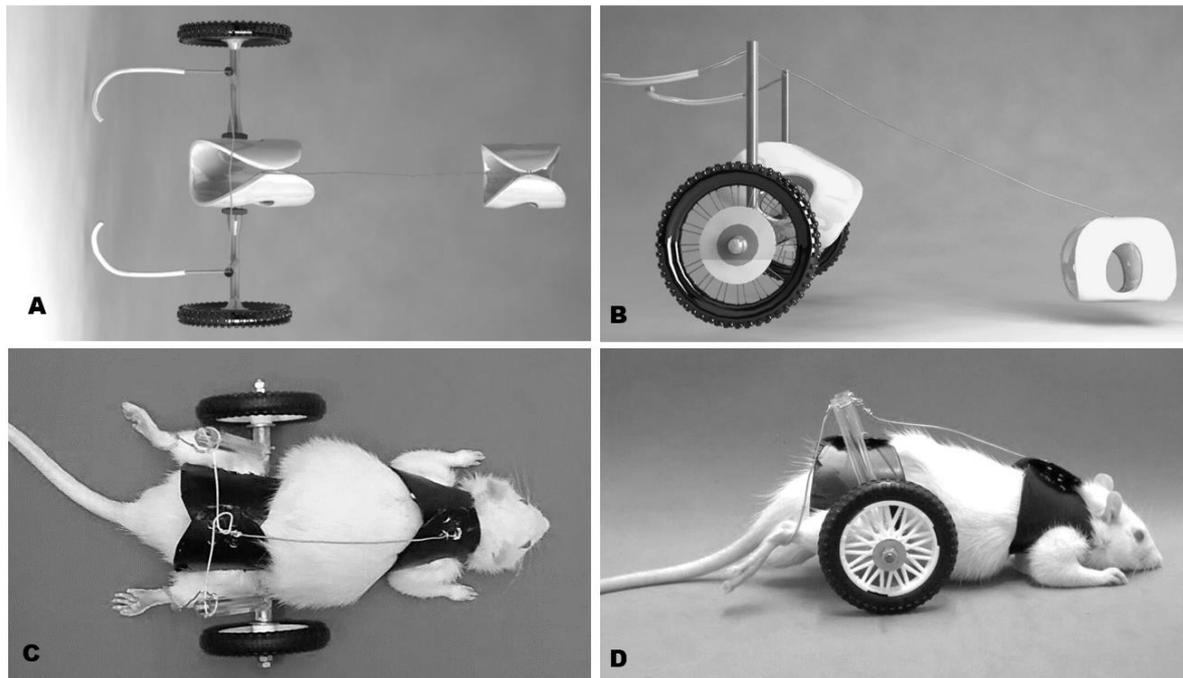


Figura 2: Dispositivo de imobilização pélvica em vista superior em projeto (A) e ajustado ao animal (C). Modelo de suspensão em vista perfil (B) e no mesmo plano (D) é possível observar o dispositivo ajustado ao animal.

Avaliações

Avaliação das reservas musculares de glicogênio (índice metabólico)

Foram coletadas amostras dos músculos: reto femoral (RF), adutor curto (ADC), adutor longo (ADL), abdominal inferior (ABI), abdominal superior (ABS), glúteo médio (GL Med), glúteo máximo (GL Max), Iliopsoas (ILP) e um feixe dos paravertebrais (PV) da região pélvica. Utilizou-se o método do fenol sulfúrico¹⁷, no qual as amostras musculares são digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. Entre uma fase e outra da precipitação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos e o glicogênio precipitado foi submetido a hidrólise ácida na presença de fenol. Os valores foram expressos em mg/100mg de peso úmido.

Concentração de Proteínas Totais e DNA (índice de mionúcleos):

Após análise do glicogênio muscular e determinação dos dois músculos mais comprometidos do ponto de vista energético, amostras serão encaminhadas para avaliação da concentração de proteínas totais, através do Kit PROTAL da Laborlab®, e da quantidade de DNA por meio do método da difenilamina em que o homogenato tecidual é submetido à presença de uma solução de difenilamina e posteriormente a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm, conforme proposta de Giles e Myers¹⁸.

Teste de tolerância a insulina (ITT)

Para identificar uma possível resistência insulínica, realizou-se o ITT, de modo que no 6º dia os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico e após 10 minutos realizou-se um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste, determinando assim o tempo zero. Sequencialmente a administração de insulina (2 U/Kg/ip - Biohulin) realizou-se a coleta de sangue nos tempos 2,5 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min para que a glicemia fosse novamente avaliada para determinar a constante de decaimento da glicemia (KITT). O grupo RP7 foi avaliado 6 dias após a retirada do modelo de imobilização.

Dosagem sérica de Interleucina 6, 10 e TNF- α

Foi utilizado o método ELISA e seguiu-se as especificações correspondentes ao Kit (BioSource International). Após anestesia com pentobarbital sódico (40 mg/Kg), amostras sanguíneas foram coletadas pela veia renal, e assim foram acondicionadas sob gelo. O soro foi isolado, acondicionado em eppendorf e reservado em freezer -70°. Os valores estão expressos em pg/mL.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA F e post hoc de Tukey, no software SPSS® versão 16. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

Eutanásia

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg) e foram submetidos a técnica de deslocamento cervical. O grupo RP7 passou por eutanásia 7 dias após a retirada do dispositivo de imobilização.

RESULTADOS

AVALIAÇÃO DAS RESERVAS GLICOGÊNICAS

Constatou-se que a musculatura do grupo submetido a imobilização pélvica (IP) ficou severamente comprometida em comparação com o grupo controle, de modo que as reservas glicogênicas atingiram níveis críticos de redução, como pode ser observado na tabela 1, que apresenta o percentual de redução, bem como os valores (tabela 2) da concentração de glicogênio que expressam diferença estatística ($p < 0,05$).

Muito embora o grupo RP7 tenha retomado a deambulação por 7 dias, constata-se que as reservas glicogênicas não foram reestabelecidas na comparação com o grupo C. Por outro lado, na comparação com o grupo IP houve elevação das reservas musculares de glicogênio ($p < 0,05^{\#}$) conforme apontamento nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Percentual de redução da reserva energética (glicogênica) dos músculos envolvidos no processo de imobilização pélvica dos grupos IP e RP7 comparados ao controle ($p < 0,05^*$) e percentual de aumento na comparação RP7 e IP ($p < 0,05^{\#}$).

Músculo	↓ % Glicogênio IP/C*	↓ % Glicogênio RP7/C*	↑ % Glicogênio RP7/IP [#]
Glúteo máximo	76 %	55%	21 %
Glúteo médio	69%	47%	22 %
Paravertebrais	64%	43%	21 %
Adutor curto	57%	53%	-
Adutor longo	67%	53%	14 %
Reto femoral	70%	48%	22 %
Iliopsoas	75%	60%	15 %
Abdominal superior	66%	40%	26 %
Abdominal inferior	75%	55%	20 %

Tabela 2. Concentração de glicogênio (mg/100mg) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP) e remobilizado após 7 dias (RP7). Os valores correspondem a média \pm epm, $n=12$, $p < 0,05^*$ comparado ao controle e $p < 0,05^{\#}$ comparado ao IP.

Músculos	C	IP	RP7
Glúteo máximo	0,85 \pm 0,03	0,20 \pm 0,08*	0,38 \pm 0,03* [#]
Glúteo médio	0,87 \pm 0,04	0,26 \pm 0,03*	0,46 \pm 0,05* [#]
Paravertebrais	0,81 \pm 0,05	0,29 \pm 0,03*	0,46 \pm 0,05* [#]
Adutor curto	0,75 \pm 0,03	0,32 \pm 0,05*	0,35 \pm 0,03*
Adutor longo	0,94 \pm 0,01	0,31 \pm 0,03*	0,44 \pm 0,02* [#]

Reto Femoral	0,85±0,03	0,23±0,04*	0,41±0,03*.#
Iliopsoas	0,98±0,01	0,24±0,03*	0,40±0,04*.#
Abdominal superior	0,88±0,03	0,30±0,07*	0,52±0,02*.#
Abdominal inferior	1,02±0,06	0,25±0,03*	0,46±0,01*.#

O conjunto de dados referente a sensibilidade insulínica revelou que não houve alterações importantes entre os grupos C ($9,10 \pm 0,02$) e RP7 ($9,13 \pm 0,02$). Por outro lado, o grupo IP apresentou retardo de 10% ($8,24 \pm 0,03$) na constante de decaimento quando comparado ao C (figura 3). Esta avaliação indica que o desuso promovido pela órtese pode interferir na sensibilidade tecidual.

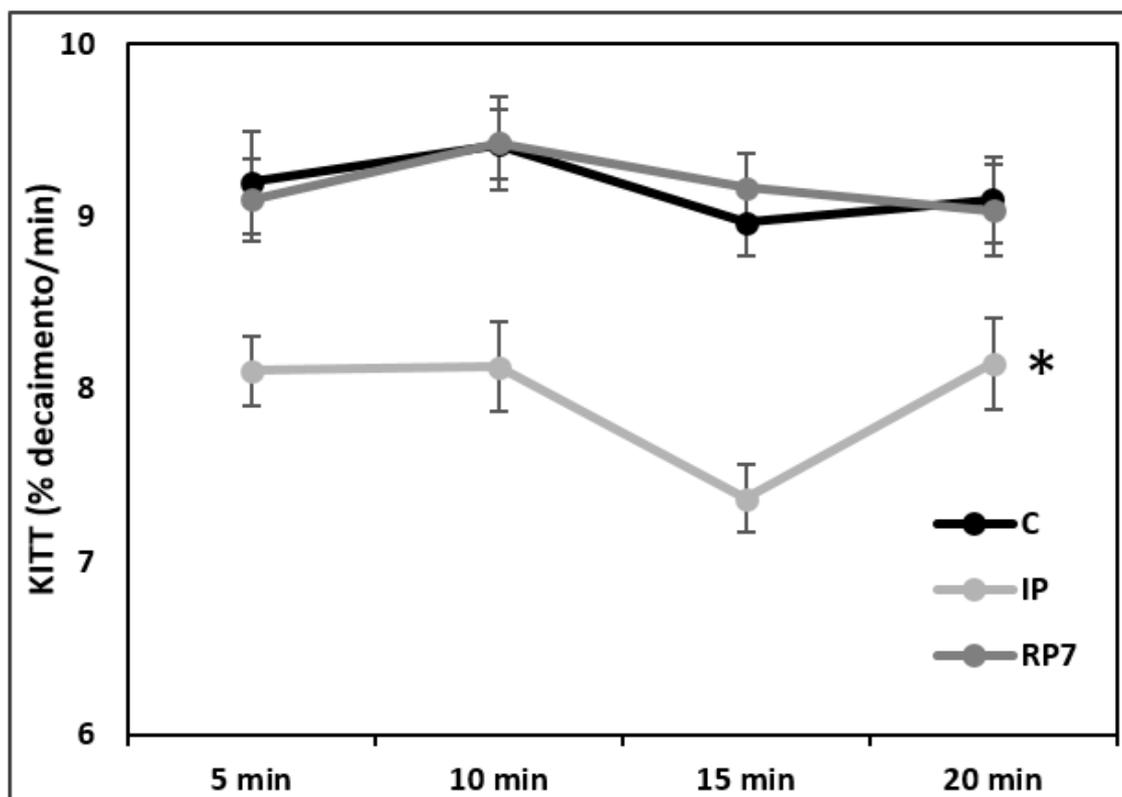


Figura 3. Constante de decaimento de glicose (KITT; % min) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP) e remobilizado após 7 dias (RP7). Os valores correspondem à média \pm epm, $n=6$ $p<0,05^*$ comparado ao C.

Avaliação da razão proteína total/DNA

Considerando que o músculo glúteo máximo (GL Max) e o iliopsoas (ILP) tiveram suas reservas glicogênicas mais comprometidas, esses foram encaminhados para determinação da razão proteína total/DNA. Assim, foi constatado que os grupos IP e RP7

apresentaram redução ($p < 0,05^*$) de 28 e 24% no GL Max e 32 e 16% no ILP respectivamente em relação ao grupo C. Por outro lado, o grupo RP7 comparado ao IP apresentou menor comprometimento da razão proteína total/DNA, evidenciado por um aumento de 19% ($p < 0,05^{\#}$) no músculo ILP, conforme ilustrado na figura 4.

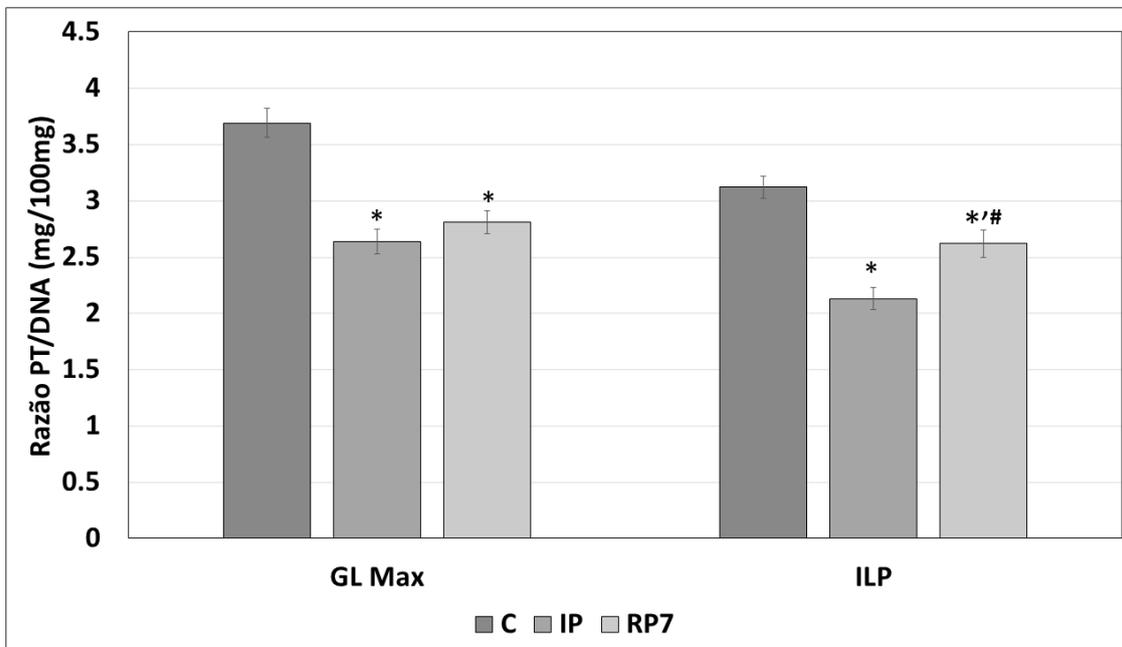


Figura 4. Razão proteína total/DNA (mg/100mg) dos músculos glúteo máximo (GL Max) e Iliopsoas (ILP) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP) e remobilizado pós 7 dias (RP7). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6, onde * $p < 0,05$ comparado ao controle e $^{\#}p < 0,05$ comparado ao IP.

AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS

Na avaliação da concentração sérica de interleucina 6 houve elevação de 27,3% no grupo IP e 19,2% no grupo RP7 comparados ao C. Identificou-se que a interleucina 10 expressou elevação de 30,4% e 14,9% nos grupos IP e RP7 respectivamente. Por fim, o fator de necrose tumoral (TNF- α) apresentou discreta elevação de 5% no IP comparado ao grupo C, enquanto o grupo RP7 não apresentou diferença comparado ao C (figura 5).

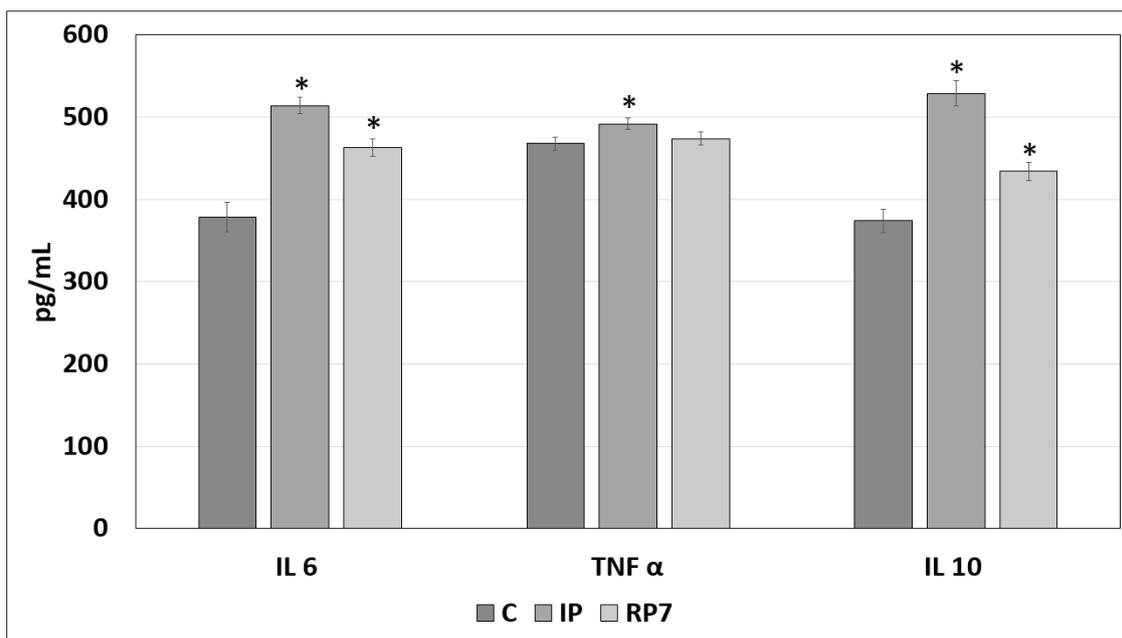


Figura 5. Concentração sérica de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral (TNF- α) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP) e remobilizado após 7 dias (RP7). Os valores são expressos em pg/ml e correspondem à média \pm epm, n=6 p<0,05* comparado ao C.

DISCUSSÃO

A cintura pélvica é uma estrutura de grande importância para a locomoção, de modo que frequentemente pode ser afetada por condições que necessitem de imobilização terapêutica, que por sua vez pode desencadear a síndrome do desuso.^{1,2,6}

Estudos apontam que após 48 horas de desuso o tecido muscular sofre modificações de grande magnitude tais como; alteração em mecanismos de sinalização insulínica, aumento de citocinas inflamatórias, redução nas reservas glicogênicas, bem como redução no conteúdo proteico, além de alterações de repercussões histológicas e moleculares^{8,19}. Embora os efeitos da imobilização possam surgir após algumas horas, a literatura apresenta um consenso no tempo de 7 dias de imobilização.^{9,10}

No presente estudo foi constatado que tanto as reservas glicogênicas quanto a constante de decaimento (KITT) foram comprometidas nos animais que tiveram a pelve imobilizada, o que indica comprometimento da síntese glicogênica, além possível alteração na dinâmica de sinalização insulínica. Muito embora os animais remobilizados

após 7 dias (RP7) não tenham recuperado as reservas glicogênicas, observou-se que o KITT foi similar ao grupo controle, fato sugestivo da ativação de vias anabólicas e inibição catabólica.

Esses achados estão sustentados pelos mecanismos de regulação da síntese do glicogênio, uma vez que a insulina enquanto hormônio anabólico estimula o acúmulo de glicogênio por meio do aumento no transporte de glicose no músculo, ao mesmo tempo em que favorece a síntese de glicogênio no fígado e tecido muscular, processo esse que ocorre via desfosforilação da enzima glicogênio sintetase.²⁰

A compreensão da repercussão sistêmica pode ser baseada no fato de que logo após estímulo com insulina, a Akt fosforila e inativa a GSK-3, o que reduz a taxa de fosforilação da glicogênio sintetase aumentando sua atividade. Ressalta-se que a insulina também ativa a proteína fosfatase 1, por um mecanismo dependente da PI 3-quinase, que desfosforila a glicogênio sintetase diretamente.²¹

A razão proteína total/DNA dos músculos GL max e ILP foi severamente reduzida. Nesse sentido, sabe-se que o controle da síntese de proteínas inicia-se com a formação do ácido ribonucléico (RNA) no núcleo, sob controle do ácido desoxirribonucléico (DNA). Assim, redução na atividade contrátil interfere em mecanismos fundamentais para que haja captação de aminoácidos no tecido muscular, uma vez que a taxa de transporte de aminoácidos é proporcional à atividade contrátil, independente da ação insulínica^{19,22,23}. Fatores anatômicos e biomecânicos podem ter influenciado para que o músculo ILP apresentasse maior comprometimento.

Considerando a relação das citocinas IL-6, 10 e TNF- α com o tecido muscular, bem como a expressão do RNAm dependente da atividade contrátil do músculo, foi constatado que o modelo de imobilização proposto ativou mecanismos pró-inflamatórios (TNF- α e IL-6) e anti-inflamatórios (IL-10), que tiveram maior expressão no grupo IP. Destaca-se que alterações nas concentrações dessas citocinas podem influenciar diretamente mecanismos de captação de glicose, atividade mitocondrial, oxidação lipídica, bem como fosforilação do receptor de glicose tipo I (IRS-I), o que merece atenção para o desuso muscular.^{24,25}

No presente estudo a IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória, apresentou-se mais elevada que a IL-6, que é pró inflamatória. Isso indica que a imobilização pélvica desencadeou resposta inflamatória em maior intensidade, uma vez que, quando o conteúdo de glicogênio muscular está reduzido ocorre ativação na transcrição do gene de IL-6²⁴. Aponta-se ainda que a expressão de IL-10 foi menor no grupo RP7, ao passo

em que a concentração de TNF- α não foi alterada no mesmo grupo. Convém ressaltar que a IL-10 é a principal citocina anti-inflamatória moduladora na produção de TNF- α .²⁶

Muito embora o grupo IP tenha apresentado discreta elevação de TNF- α , vale notar que a produção de TNF- α não é exclusivamente executada por monócitos e macrófagos, haja vista que a expressão gênica e proteica de TNF- α no músculo esquelético foi caracterizada em humanos, em um estudo que demonstrou, pela primeira vez, a presença dessa citocina na ausência de monócitos infiltrados ou macrófagos²⁷. Tal fato evidencia que o próprio tecido muscular pode produzi-la, e assim atuar de maneira autócrina e parácrina em quantidade necessária para modular uma série de alterações morfológicas e funcionais no tecido sob catabolismo²⁸.

É notório que as alterações fisiológicas aqui apresentadas têm semelhança com às observadas em outros modelos experimentais de desuso muscular^{9,10,15}, o que confere a esse modelo dupla utilidade ao favorecer o estudo tanto de sistemas fisiológicos sob condições de microgravidade simulada, quanto a condições de atividade muscular reduzida. Chama-se a atenção para o grande diferencial da metodologia proposta no presente estudo, a qual envolveu grandes grupos musculares ao imobilizar cintura pélvica e membros posteriores.

Por fim, vale ressaltar que o modelo proposto apresenta alguns diferenciais de outros já descritos na literatura, como a não limitação da locomoção e menor interferência na curvatura da coluna vertebral em comparação ao modelo de suspensão, maior número de músculos envolvidos e melhor posicionamento articular comparado a modelos de gesso ou resina acrílica. Além disso, embora o modelo tenha induzido um quadro de atrofia severa como constatado, ainda assim essa condição é passível de reversão, diferentemente de modelos de desnervação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo proposto de imobilização pélvica em condição experimental mostra-se eficaz em mimetizar o desuso muscular, fato esse evidenciado pela redução nas reservas energéticas dos músculos pélvicos, acompanhada por redução também na razão proteína total/DNA. Notou-se ainda que o modelo induziu a resposta inflamatória modulada pelas citocinas analisadas. Destaca-se que a praticidade metodológica e o baixo custo do modelo merecem destaque no encorajamento de futuros estudos que possam buscar por

estratégias precoces de intervenção fisioterapêutica para os casos de comprometimento funcional de grande magnitude, conforme o repouso prolongado no leito.

REFERÊNCIAS

1. Kurki H. Skeletal variability in the pelvis and limb skeleton of humans: does stabilizing selection limit female pelvic variation? *Am J Hum Biol.* 2013. 25:795–802.
2. Gruss LT, Schmitt D. The evolution of the human pelvis: changing adaptations to bipedalism, obstetrics and thermoregulation. *Biol Sci.* 2015 Mar; 370(1663).
3. Haws BE, Wuertzer S, Raffield L, Lenchik L, Miller AN. Criteria for level 1 and level 2 trauma codes: Are pelvic ring injuries undertriaged? *World J Orthop.* 2016 Aug; 7(8):481-6.
4. Dunet B, Tournier C, Billaud A, Lavoine N, Fabre T, Durandeu A. Acetabular fracture: long-term follow-up and factors associated with secondary implantation of total hip arthroplasty. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2013; 99:281-290.
5. Dodd AC, Bulka C, Jahangir A, Mir HR, Obrebsky WT, Sethi MK. Predictors of 30-day mortality following hip/pelvis fractures. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2016 Aug; 2.
6. Lee C, Porter K. The prehospital management of pelvic fractures. *Emerg Med J.* 2007 Feb; 24(2):130-3.
7. Petrini AC, Ramos DM, Gomes de Oliveira L, Alberto da Silva C, Pertille A. Prior swimming exercise favors muscle recovery in adult female rats after joint immobilization. *J Phys Ther Sci.* 2016 Jul; 28(7):2072-7.
8. Rudrappa SS, Wilkinson DJ, Greenhaff PL, Smith K, Idris I, Atherton PJ. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. *Front Physiol.* 2016 Aug; 7:361.
9. Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensão A, Magalhães J, Duarte J, Amado F. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações

- teciduais e fisiopatologia. *Rev Port Cienc Desp.* 2004; 4(3):94–111.
10. Durigan JLQ, Cancelliero KM, Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ. Modelos de desuso muscular e estimulação elétrica neuromuscular: aspectos pertinentes à reabilitação fisioterapêutica. *Fisioter Mov.* 2005 dez; 18(4).
 11. Yoshida S, Matsuzaki T, Kamijo. Histopathological Changes in the Periphery of the Sciatic Nerve of Rats after Knee Joint Immobilization. *J Phys Ther Sci.* 2013 May; 25(5):623–626.
 12. Yoshida S, Matsuzaki T, Hosono M. An immunohistochemical study of the sciatic nerve in a rat knee immobilization model. *J Phys Ther Sci.* 2016 Apr; 28(4):1116-9.
 13. Stokes IA, McBride CA, Aronsson DD. Intervertebral disc changes in an animal model representing altered mechanics in scoliosis. *Stud Health Technol Inform.* 2008; 140:273-7.
 14. Silva CA, Guirro RR, Delfino GB, Arruda EJ. Proposal of non-invasive experimental model to induce scoliosis in rats. *Rev Bras Fisioter.* 2012 Jun; 16(3):254-60.
 15. Guirro RRJ, Arruda EJ, Silva CA. Disuse induced by the spine rectification vest: experimental study. *Fisioter Pesqui.* 2014; 21:21-26.
 16. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition, National Academies Press (US); 2011.
 17. Siu LO, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J App Physiol.* 1970; 28(2), 234-6.
 18. Giler KW, Myers A. An improved diphenylamine method for the stimulation of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1965; 206:93-99.
 19. Kodama FY, Camargo RC, Job AE, et al. Muscle mechanical properties of adult and older rats submitted to exercise after immobilization. *Acta Ortop Bras.* 2012; 20:218–222.
 20. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(4):419-425.
 21. 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.

22. Kimbal SR, Vary TC, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by insulin. *Rev. Physiol.* 1994. 56:321-48.
23. Liu X, Trakooljul N, Hadlich F, Muráni E, Wimmers K, Ponsuksili S. MicroRNA-mRNA regulatory networking fine-tunes the porcine muscle fiber type, muscular mitochondrial respiratory and metabolic enzyme activities. *BMC Genomics.* 2016 Aug;17:531.
24. Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, Neufer PD. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J.* 2001; 15:2748-50.
25. Tyrone AW, James PW, Davis JM, Wilson LB, Lowe LL, Sato S, Carson JA. Skeletal Muscle Mass Recovery from Atrophy in IL-6 Knockout Mice. *Acta Physiol.* 2011 Aug; 202(4):657–669.
26. Lopes RD, Junior MLB, Rosa JC, Lira FS, Martins Jr E, Shimura AY, et al. Alterações na Produção de IL-10 e TNF- α no Músculo Esquelético em Ratos com Insuficiência Cardíaca Secundária ao Infarto do Miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2010 Mar; 94(3):313-320.
27. Saghizadeh M, Ong J, Garvey W, Henry R, Kern P. The expression of TNF alpha by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest.* 1996; 97(4):1111-6.
28. Spate U, Schulze PC. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7:265-9.

4. Estudo – III

Influência da fotobiomodulação por terapia laser de baixa intensidade (830nm) no metabolismo muscular e concentrações de citocinas durante e após imobilização pélvica: Estudo em ratos.

Submetido: “Experimental Physiology”, em 20 de Janeiro de 2017, sob a referência nº
- EP-RP-2017-086282.

Influência da terapia laser de baixa intensidade (830nm) no metabolismo muscular e concentrações de citocinas durante e após imobilização pélvica: Estudo em ratos.

Eder João de Arruda¹, Carlos Alberto da Silva², Rafaela Ferreira³, Nivaldo Antonio Parizotto⁴.

- 1- Doutorando em Fisioterapia pelo Programa de Pós graduação da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
- 2- Docente do Programa de Pós graduação em Ciências do Movimento da Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP
- 3- Mestre em Fisioterapia pela Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP.
- 4- Docente do Programa de Pós graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Endereço para correspondência:

Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13.565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil. E-mail: ftederarruda@gmail.com

Resumo

Introdução: A fotobiomodulação pode ativar mecanismos anticatabólicos no tecido muscular em desuso. **Objetivo:** Avaliar os efeitos metabólicos da fotobiomodulação durante e após a imobilização pélvica em ratos. **Metodologia:** Utilizou-se 30 ratos distribuídos em cinco grupos (n=6), sendo; Controle (C), Imobilização pélvica (IP), Imobilizado 7 dias e remobilizado por 7 dias (IR), *Laser* durante imobilização pélvica (LDIP) e *Laser* após imobilização pélvica (LAIP). A fotobiomodulação por *laser* (Ga-Al-As; $\lambda = 830$ nm; P= 30 mW; área do feixe = 0,116cm², T= 14 s; fluência de 3,62J/cm²; E= 0,42J; densidade de potência de 0,26 W/cm²) foi aplicada 8 pontos por 7 dias consecutivos. Avaliou-se glicogênio muscular, relação proteína total/DNA, concentração plasmática de TNF- α , interleucinas 6 e 10. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA e teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de $p < 0,05$. **Resultados:** As reservas glicogênicas apresentaram-se reduzidas nos grupos imobilizados, com maior severidade no grupo IP e menor nos grupos LDIP e LAIP. A relação proteína total/DNA dos músculos adutor curto e glúteo máximo mostraram-se reduzidas em todos os grupos, mas o LDIP apresentou melhores resultados. As citocinas IL-6 e IL-10 estiveram elevadas consideravelmente no grupo IP e elevadas com menor expressão nos grupos LDIP e LAIP. O TNF- α esteve elevado nos grupos IP e IR, mas não teve significância nos grupos LDIP e LAIP. **Conclusão:** Frente a imobilização pélvica na condição experimental, a fotobiomodulação minimizou o catabolismo e apresentou melhor resposta quimiometabólica quando aplicada durante o período de imobilização.

Palavras Chave: Fotobiomodulação, infravermelho, Imobilização pélvica, músculos, ratos.

Abstract

Introduction: Photobiomodulation can activate anti-catabolic mechanisms in muscle tissue in disuse. **Objective:** To evaluate the metabolic effects photobiomodulation during and after pelvic immobilization in rats. **Methodology:** 30 rats were distributed in five groups (n = 6): Control (C), Pelvic Immobilization (PI), Immobilized 7 days and remobilized for 7 days (IR), Laser during pelvic immobilization (LDPI) and Laser after pelvic immobilization (LAPI). The photobiomodulation (Ga-Al-As, $\lambda = 830$ nm, P = 30 mW, beam area = 0.116cm², T = 14 s, Fluency of 3,62J/cm², E = 0.42J, Power density of 0.26 W/cm²) applied in 8 points for 7 consecutive days. Muscle glycogen, total protein/DNA ratio, plasma concentration of TNF- α , interleukin 6 and 10 were analyzed. The data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test followed by ANOVA and Tukey's test (with a critical level of p<0.05). **Results:** Glycogen reserves reduced in all groups, with higher severity in the PI group and lower in the LDPI and LAPI groups. The total protein/DNA ratio of the muscles short adductor and gluteus maximus decreased in all groups, however LDPI showed better results. IL-6 and IL-10 cytokines were elevated considerably in the IP group and elevated with a lesser extent in the LDPI and LAIP groups. TNF- α raised in the PI and IR groups, but there was no significant changes in LDPI and LAPI groups. **Conclusion:** Before pelvic immobilization in the experimental condition, the photobiomodulation minimized catabolism mechanisms and presented a better chemo-metabolic response when applied during the immobilization period.

Key words: Photobiomodulation, infrared, pelvic immobilization, muscles, rats.

Introdução

O tecido musculoesquelético é dotado de grande capacidade de adaptação morfológica e funcional que responde a diferentes formas de estímulo ou a diferentes formas de privação de estímulo, como em casos de atrofia induzida por desuso (Mukay *et al.*, 2016; Powers *et al.*, 2016).

Com destaque para situações de privação de estímulo, tanto em ratos quanto em humanos, nota-se redução das reservas energéticas (Guirro, Arruda & Silva, 2014), redução do número de mionúcleos e ativação de células satélites (Li *et al.*, 2016), resistência insulínica seguida de redução na síntese proteica (Rudrappa *et al.*, 2016), dano mitocondrial (Mukay *et al.*, 2016), proliferação de fibras colágenas, redução na efetividade da junção neuromuscular, ativação de processo inflamatório e inibição de fatores de crescimento (Frara *et al.*, 2016), alteração na formação do complexo actomiosina, menor disponibilidade de Ca^{2+} e alteração no tipo de fibra muscular (Lamboley *et al.*, 2016), além de outros achados compatíveis com o quadro de atrofia muscular.

Estudos recentes apresentam diferentes propostas para o estudo da atrofia muscular por desuso, de modo que os modelos utilizados são discriminados em modelos invasivos e não invasivos, os quais se diferem quanto as variantes de complexidade em suas formas de aplicação com foco nos membros posteriores de ratos (Yoshida, Matsuzaki & Hoso, 2016; Chowdhury *et al.*, 2016). Destaca-se ainda, a existência de modelos invasivos e não invasivos de indução de escoliose e restrição do tronco (Stokes, McBride & Aronsson, 2008; Silva *et al.*, 2012; Guirro, Arruda & Silva, 2014).

Condições de desuso podem instalar um quadro de incapacidade, que em alguns casos podem causar danos irreversíveis, fato este que requer estratégias de intervenção precoce. Esse ponto de atenção tem feito com que a fisioterapia e outras áreas empenhem esforços no desenvolvimento de metodologias e aprimoramento de recursos que possam ser aplicados de forma mais precoce possível em prol da recuperação funcional (Silva *et al.*, 2012).

Nesse sentido, a fotobiomodulação (FBM) pela terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) é considerada como uma estratégia de intervenção terapêutica segura e eficaz aplicada ao tecido muscular, uma vez que a FBM é favorável à redução de infiltrado inflamatório, redução da peroxidação lipídica, da concentração de creatina kinase, da

expressão de citocinas pró-inflamatórias, estimula a formação de miotubos, promove angiogênese, eleva o número de fibras em regeneração, bem como a atividade mitocondrial, além de melhorar a organização de fibras musculares regeneradas, aumentar a disponibilidade de energia celular e induzir a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular que ativam células satélites (Ferraresi *et al.*, 2015; Fritsch *et al.*, 2016).

Com foco no tecido muscular em atrofia, Nakano *et al.* (2012) utilizaram a FBM por LLLT em ratos (Ga–Al–As, 830 nm; 60 mW, 0.6J/cm², total 180 s) e constatou aumento de células satélites e angiogênese. Em células musculares distróficas, constatou-se que a FBM por LLLT (Ga–Al–As, 830 nm, 30 mW, 5J/cm²) mostrou-se eficaz na proliferação celular, redução do estresse oxidativo e redução do processo inflamatório (Macedo *et al.*, 2015).

Mais recentemente uma revisão sistemática apontou que no aspecto experimental para afecções locomotoras os comprimentos de ondas mais utilizados tem sido 904 nm e 830 nm, de modo que as doses variam de 0,12J a 50J. Assim, a redução da resposta inflamatória tem sido o achado mais comum mediante a FBM em lesões ortopédicas agudas (Souza & Silva, 2016).

Diante da condição catabólica que o tecido muscular pode apresentar em condição de desuso, a FBM configura-se como uma importante estratégia de intervenção. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas metabólicas sob as reservas glicogênicas, relação proteína total/DNA e citocinas inflamatórias mediante o uso da FBM por LLLT durante e após período de imobilização pélvica em ratos.

Metodologia

Esse estudo teve aprovação do comitê de ética em experimentação animal da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) sob protocolo nº 05/2014. Seguiu-se os princípios éticos estabelecidos na oitava edição do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011).

Utilizou-se 30 ratos machos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), idade de 3 meses e massa corporal de 250±20g. Os animais foram distribuídos em cinco grupos (n=6), sendo; Controle (C), Imobilização pélvica (IP), imobilizado por 7 dias e remobilizado por mais 7 dias (IR), Laser durante os 7 dias de imobilização pélvica (LDIP) e Laser por 7 dias após o período de imobilização (LAIP).

Modelo de imobilização pélvica

O modelo deriva do estudo de Silva *et al.*, (2012), que propuseram uma forma de imobilização com a finalidade de gerar escoliose. O que difere no presente estudo, é que o modelo utilizado, além de não desenvolver inclinação da coluna, possui um sistema de suspensão com rodas e hastes, de modo que pelve e membros posteriores fiquem suspensos, conforme figura 1.

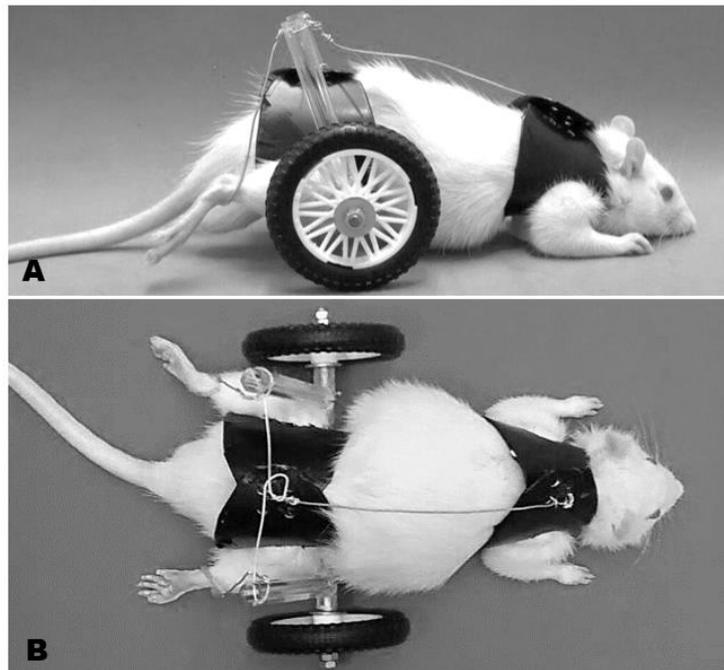


Figura 1: Modelo de imobilização pélvica em vista perfil (A) e vista superior (B).

Protocolo de Fotobiomodulação

Características do equipamento e parâmetros utilizados

Foi utilizado o equipamento Laserpulse Ibramed®, semicondutor Diodo de Arseneto de Gálio Aluminizado (Ga-Al-As). O equipamento passou por calibração (Masterfield, Filter Coherent, Santa Clara, CA) antes e após os procedimentos experimentais, pelo Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CPOF) do Instituto de Física de São Carlos, de modo que esse procedimento assegurou alta confiabilidade pelo *laser*.

Com base na literatura que apresenta resultados *in vivo* e *in vitro* (Macedo *et al.*, 2015; Souza & Silva, 2016), utilizou-se comprimento de onda de 830 nm (infravermelho), potência óptica de saída de 30 mW, área de secção transversal do feixe de 0,116cm², tempo de irradiação de 14 segundos (s) por ponto (8 pontos), fluência de 3,62J/cm²,

energia por ponto 0,42J, densidade de potência de 0,26 W/cm², e emissão em modo contínuo.

Aplicação da técnica

O protocolo de tratamento por FBM constituiu na aplicação de LLLT durante 7 dias consecutivos, por meio da técnica pontual em contato com ângulo de incidência do feixe mantido perpendicular (90 graus) a superfície de irradiação. Foram estabelecidos 4 pontos de aplicação na região dorsal (figura 2, A) e 4 pontos na região ventral, sendo que tanto na face ventral quanto dorsal os pontos foram estabelecidos acima e abaixo da articulação coxofemoral. Sem a necessidade de anestesia ou sedação, dois pesquisadores participaram desse procedimento, onde o primeiro soltou a parte anterior do colete e usou tecido de algodão para assegurar a contenção da cabeça e tronco do animal, enquanto o segundo pesquisador foi responsável pela aplicação da FBM por LLLT. O grupo estimulado durante o período de imobilização (figura 2, B) teve o dispositivo perfurado para que assim fosse mantida a restrição. Convém ressaltar que o dispositivo utilizado na imobilização pélvica foi projetado para não interferir nas atividades de defecação e micção do animal.

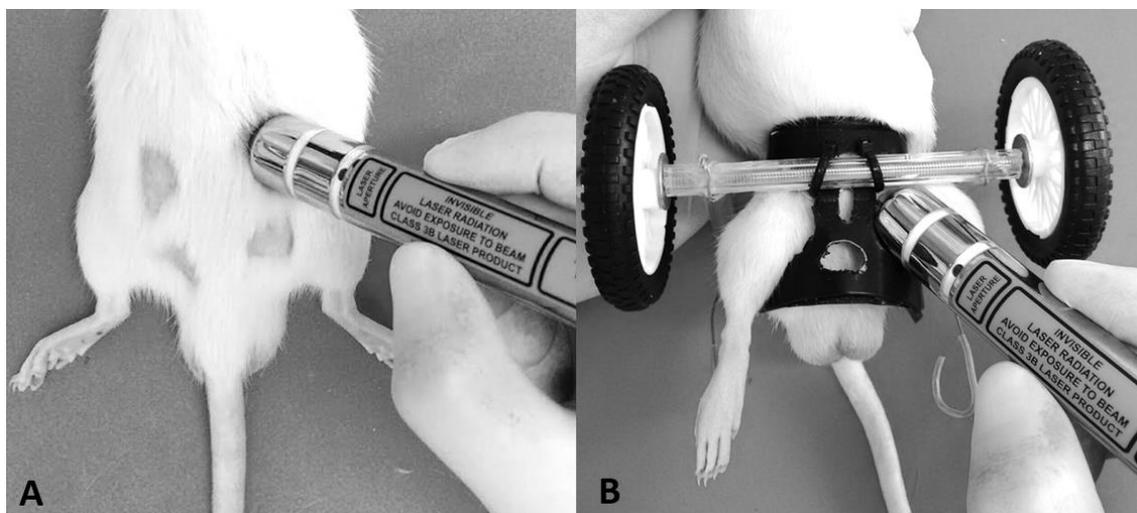


Figura 2: Pontos de aplicação FBM por terapia *laser* de baixa intensidade nos grupos LAIP (A) e LDIP (B).

Amostragem

Após o período experimental, os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação tendo o sangue coletado e centrifugado para separação do plasma que foi direcionado a avaliação bioquímica. A seguir amostras dos músculos da pelve foram

coletadas em ambiente sob gelo e direcionado as avaliações de glicogênio e proteína total/DNA.

Reservas glicogênicas

Os músculos glúteos máximo (GL Max) e médio (GL Med), paravertebral (Pv), adutor curto (Adu C), adutor longo (Adu L), reto femoral (RF), iliopsoas (iIp), supra abdominal (SA) e infra abdominal (IA) foram submetidos ao método de hidrólise ácida na presença de fenol (Siu, Russeau & Taylor, 1970). Os valores estão expressos em mg/100 mg de peso úmido.

Índice de mionúcleos: Concentração de Proteínas Totais e DNA

Foi utilizado o Kit PROTAL da Laborlab® para avaliar a concentração de proteínas totais. O método proposto por Giles & Mayers (1965) foi utilizado na quantificação do DNA. Essas análises foram desenvolvidas com os músculos glúteo máximo (região dorsal) e adutor curto (região ventral).

Dosagem sérica de Interleucina 6, 10 e TNF- α

Utilizou-se o método ELISA, seguindo as especificações correspondentes ao Kit (BioSource International) (NISHIYAMA *et al.*, 2000).

As amostras sanguíneas foram coletadas pela veia renal após decapitação, sendo essas amostras coletadas sob gelo. O soro foi isolado, acondicionado em *ependorf* e reservado em freezer -70° . Os valores são expressos em pg/mL.

Análise Estatística: Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA-F e teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Reservas glicogênicas

Na análise do metabolismo energético da musculatura envolvida na imobilização pélvica, constata-se que o grupo IP apresenta severa redução que atinge valores médios de 70% comparado ao grupo C. O músculo infra abdominal, que tem importante ação na

pele, demonstrou maior comprometimento (tabela 1). O grupo IR apresenta valores médios reduzidos em 52% comparado ao C, mas foi evidente que a retomada da locomoção (sem o dispositivo) elevou as reservas glicogênicas até valores médios de 18% comparado ao grupo IP. Frente a remobilização, o músculo adutor curto apresentou menor resposta, enquanto o músculo infra abdominal apresentou melhor resposta no que se refere as reservas energéticas.

Ambos os grupos submetidos a laserterapia durante (LDIP) e após (LAIP) o período de imobilização pélvica não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) entre si. Por outro lado, a laserterapia (durante e após a imobilização) assegurou menor comprometimento das reservas glicogênicas, onde expressou valores médios de 42,5% de redução na comparação com o grupo C. Na comparação entre LDIP e IP, observa-se elevação média de 28% ($p<0,05$) nas reservas glicogênicas. Ao se comparar LAIP e IR, somente os músculos infra abdominais, adutor curto e longo apresentam discreta elevação no conteúdo glicogênico. Os valores de média e erro padrão da média são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Glicogênio muscular (mg/100mg) dos músculos glúteo máximo (GL Max), glúteo médio (GL Med), paravertebral (Pv), adutor curto (Adu C), adutor longo (Adu L), reto femoral (RF), iliopsoas (iIp), supra abdominal (SA) e infra abdominal (IA) dos grupos Controle (C), Imobilização pélvica (IP), imobilizado por 7 dias e remobilizado por mais 7 dias (IR), Laser durante os 7 dias de imobilização pélvica (LDIP) e Laser por 7 dias após o período de imobilização (LAIP). Os valores correspondem a média±erro padrão da média $p<0,05^*$ diferente controle (C), $p<0,05^{\#}$ diferente do IP e $p<0,05^e$ diferente do IR.

Músculo	C	IP*	IR*,#	LDIP*,#	LAIP*,#
GL Max	0,85±0,03	0,20±0,08	0,38±0,03	0,43±0,03	0,47±0,08
GL Med	0,87±0,04	0,26±0,03	0,46±0,05	0,51±0,04	0,55±0,01
Pv	0,81±0,05	0,29±0,03	0,46±0,05	0,52±0,03	0,53±0,02
Adu C	0,75±0,03	0,32±0,05	0,35±0,03	0,41±0,04	0,48±0,04 ^e
Adu L	0,94±0,01	0,31±0,03	0,44±0,02	0,51±0,03 ^e	0,54±0,06 ^e
RF	0,85±0,03	0,23±0,04	0,41±0,03	0,45±0,02	0,50±0,06
iIp	0,98±0,01	0,24±0,03	0,40±0,04	0,44±0,03	0,49±0,08
AS	0,88±0,03	0,30±0,07	0,52±0,02	0,54±0,02	0,60±0,05
IA	1,02±0,06	0,25±0,03	0,46±0,01	0,53±0,04 ^e	0,55±0,03 ^e

Ao analisar os resultados obtidos na relação proteína total/DNA dos músculos adutor curto (ADC) e glúteo máximo (GL Max) dos diferentes grupos, constatou-se que o grupo IP apresentou acentuada redução de 55% no ADC e 56% no GL Max comparado ao grupo C ($p<0,05$). O grupo IR apresentou resultados similares ao IP ($p>0,05$).

O músculo ADC do grupo LDIP apresentou relação 46% menor que o C, mas quando comparado ao IP e IR apresentou 44% e 17% maior relação PT/DNA

respectivamente ($p < 0,05$). A análise do músculo GL Max do mesmo grupo (LDIP) revelou redução de 48% na comparação com o C, que quando comparado ao IP e IR apresentou maior relação PT/DNA de 52% e 29% respectivamente.

O grupo LAIP apresentou 48% (ADC) e 47% (GL Max) menor relação PT/DNA comparado ao C ($p < 0,05$). Esse mesmo grupo (LAIP) não apresentou diferença para o músculo ADC quando comparado ao IP e IR ($p > 0,05$) e ainda apresentou relação PT/DNA 20% menor comparada ao LDIP. A relação PT/DNA do músculo GL Max do grupo LAIP não teve diferença do grupo IR e apresentou relação 22% menor na comparação com LDIP (figura 3).

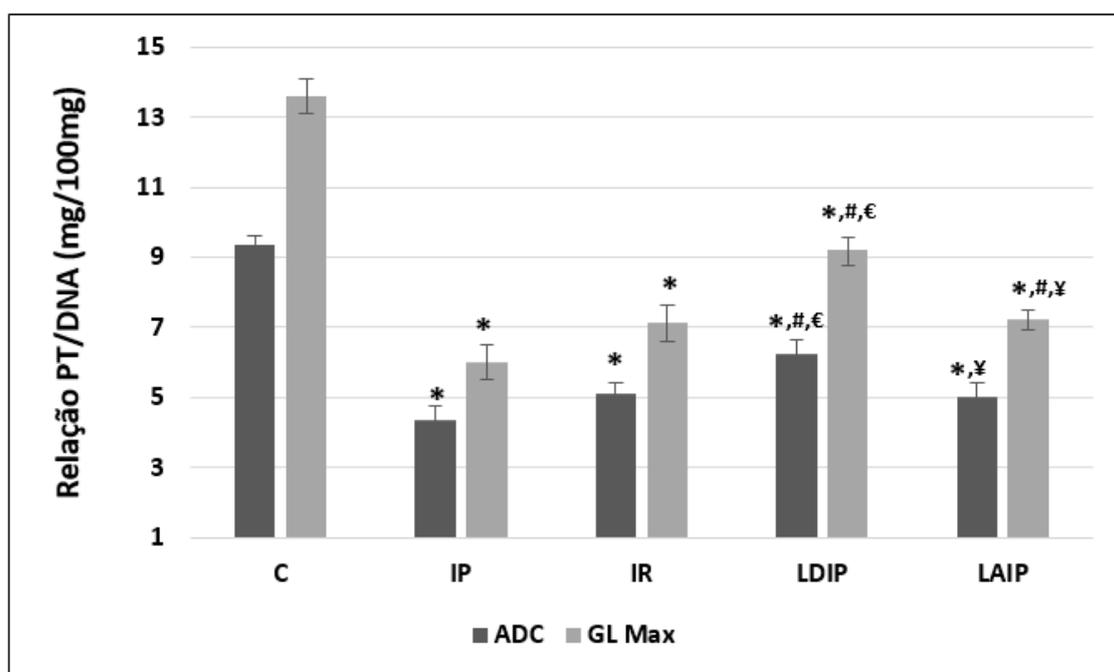


Figura 3: Relação proteína total/DNA dos músculos adutor curto (ADC) e glúteo máximo (GL Max) dos grupos Controle (C), Imobilização pélvica (IP), imobilizado por 7 dias e remobilizado por mais 7 dias (IR), Laser durante os 7 dias de imobilização pélvica (LDIP) e Laser por 7 dias após o período de imobilização (LAIP). Os valores correspondem a média \pm erro padrão da média $p < 0,05^*$ diferente controle (C), $p < 0,05^{\#}$ diferente do IP, $p < 0,05^{\epsilon}$ diferente do IR e $p < 0,05^{\text{¥}}$ diferente do LDIP.

Citocinas

Os principais achados referentes as concentrações de interleucinas (IL-6, IL - 10) evidenciaram elevações nos diferentes grupos experimentais, com destaque para a maior elevação (27% IL-6 e 30% IL-10) no grupo IP e a menor elevação (9%) de IL-6 constatada no grupo LDIP. A concentração de IL-10 esteve elevada em 27% no grupo LDIP e 12% no grupo LAIP ($p < 0,05$). No que se refere ao TNF- α a imobilização induziu a elevação

de 5% no grupo IP e apresentou-se elevado em 3% no IR. Os grupos submetidos FBM não apresentam diferença do grupo C ($p > 0,05$), conforme tabela 2.

Tabela 2: Análises das citocinas interleucina – 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF – α) e interleucina – 10 (IL – 10) dos grupos controle (C), imobilização pélvica (IP), imobilizado por 7 dias e remobilizado por mais 7 dias (IR), laser durante os 7 dias de imobilização pélvica (LDIP) e laser após os 7 dias de imobilização pélvica (LAIP). Os valores correspondem a média \pm erro padrão da média com significância de $p < 0,05^*$ diferente do C, $p < 0,05^{\#}$ diferente do IP, $p < 0,05^{\epsilon}$ diferente do IR e $p < 0,05^{\xi}$ diferente do LDIP.

Grupos	C	IP	IR	LDIP	LAIP
IL - 6	379,6 \pm 9	514,2 \pm 11*	478,8 \pm 8* \cdot #	415,2 \pm 7* \cdot #, ϵ	453,8 \pm 13* \cdot #, ϵ , ξ
TNF - α	468,6 \pm 7	492,4 \pm 6*	483,8 \pm 5*	475,4 \pm 4 $\#$	463,4 \pm 5 $\#$, ϵ , ξ
IL - 10	374 \pm 8	529 \pm 11*	489,7 \pm 7* \cdot #	475,2 \pm 9* \cdot #	423,4 \pm 6* \cdot #, ϵ , ξ

Discussão

Observa-se na literatura que a FBM tem sido cada vez mais utilizada no processo de reabilitação de diferentes afecções (Fritsch *et al.*, 2016), convém ressaltar que no presente estudo essa terapêutica foi aplicada em uma condição inédita no que se refere aos modelos de desuso apresentados até então. Foi assim que o presente estudo buscou reverter e/ou minimizar os efeitos deletérios causados pela imobilização pélvica experimental em ratos no período de 7 dias, que é um tempo já bem estabelecido no que se refere a alterações importantes para o tecido muscular (Foresto *et al.*, 2016).

Diante do desuso muscular experimental que envolve a musculatura pélvica, optou-se pela FBM por laserterapia Ga-Al-As em comprimento de onda de 830 nm, que além de atingir tecidos mais profundos, tem sido utilizada em estudos que se focam no tecido muscular (Silva & Souza 2016). Vale ressaltar que as mitocôndrias têm sido apontadas como as principais fotorreceptoras dentro das células musculares, o que faz da FBM uma estratégia altamente benéfica para o tecido muscular em estado catabólico (Ferraresi *et al.*, 2012).

Recentemente foi exposto que a FBM por LLLT (Ga–Al–As; 830 nm; 60mW; total, 180 s) aplicada em músculos atrofiados de ratos, resultou em aumento de células satélites por incorporação de 5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), angiogênese, além de favorecer a manutenção do diâmetro de miofibrilas em modelo de desuso por suspensão (Nakano *et al.*, 2009). Com efeito, o presente estudo utilizou de um modelo de desuso pélvico que resultou em atrofia muscular e foi submetido a FBM por LLLT (Ga–Al–As; 830 nm; 30mW, 3,62J/cm²; total, 112 s), a qual mostrou-se efetiva em alterar as respostas quimiometabólica nas diferentes condições experimentais.

Com destaque para a utilização da FBM durante o período de imobilização (LDIP), nota-se que as reservas energéticas (tabela 1), relação PT/DNA (figura 3) e citocinas inflamatórias (tabela 2) apresentaram melhores resultados mesmo em condição de restrição. Muito embora o grupo submetido a FBM após o período de restrição (LAIP) tenha apresentado resultados expressivos, convém ressaltar que esse grupo já não estava limitado pelo modelo de imobilização, fato este que por si só já pode acionar mecanismos de reversão da atrofia por desuso.

Estudos relataram que a necessidade de glicose passa a ser maior em músculos sob condições de atrofia, ao passo que os níveis de enzimas glicolíticas aumentam após voo espacial (Fitts *et al.*, 2000). No presente estudo foi constatado que as reservas glicogênicas da musculatura envolvida na imobilização pélvica (IP) foram severamente reduzidas a valores de até 70%, fato este que chama a atenção para a necessidade de intervenção precoce em condições similares de grande envolvimento muscular.

No que se refere ao comportamento das reservas de glicogênio do grupo LDIP comparado ao IP, a literatura (Fritsh *et al.*, 2016) aponta que sob condições de depleção de substratos energéticos como na fadiga muscular, a FBM pode estimular a função mitocondrial, melhorar a microcirculação e elevar a síntese de ATP. Contudo, estudos recentes têm investigado o uso da FBM para a melhora da resistência a fadiga e melhora do metabolismo energético do tecido muscular (Leal *et al.*, 2010), ao passo que esses achados podem ser aplicados tanto na melhora do desempenho, quanto na recuperação de músculos em desuso.

O comportamento das reservas energéticas dos grupos LDIP e LAIP, foi favorecido pela FBM, possivelmente pela excitação das fibras musculares e modulação indireta da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ que é dependente de ATP (Allen *et al.*, 2008). Dessa forma, as mitocôndrias que estão no entorno dos túbulos T, bem como as cisternas de Ca^{2+} podem ser estimuladas pela FBM elevando assim a síntese de ATP. Contudo, a maior condutância dos canais de Cl^- nos tubulos T reduz a acumulação de K^+ nesses tubulos, condição essa favorável a excitabilidade e restabelecimento do potencial de membrana das fibras musculares (Allen *et al.*, 2008; Ferraresi *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm apresentado a razão proteína total/DNA como indicativo da presença de hiperplasia e/ou hipertrofia muscular, ao passo que o aumento na concentração de DNA aponta para aumento do número de fibras musculares. Entretanto, um incremento da razão proteína total/DNA apontaria para aumento da área de secção transversa da fibra muscular (Wen *et al.*, 2014). No presente estudo foi constatado que a

FBM por LLLT durante a imobilização foi efetiva para a melhor relação PT/DNA (figura 3), fato esse sugestivo de ativação de mecanismos anticatabólicos quando o tecido muscular ainda está sob efeito do desuso gerado pelo modelo pélvico.

É importante salientar que o grupo submetido a FBM após o período de imobilização, mesmo livre da limitação imposta pela imobilização pélvica, não apresentou diferença significativa para o músculo adutor curto do grupo IP, de modo que foi pouco expressivo para com o músculo glúteo máximo também comparado ao grupo IP. Um fato interessante é que modelos humanos de repouso no leito e imobilização de membros revelam taxas de síntese protéica atenuadas após 7 dias (Glover *et al.*, 2008), o que reforça o uso de estratégias preventivas durante esse período.

É apontado que a atrofia muscular pode ser desencadeada por uma redução na taxa de síntese proteica, por um aumento na taxa de degradação ou por um declínio simultâneo na síntese em combinação com um aumento na degradação (Gordon *et al.*, 2013). Assim, com base nos resultados de PT/DNA do presente estudo, é importante ressaltar que somente a remobilização (IR) não foi eficaz em reverter a perda de massa muscular na condição estudada.

Nesse contexto, por ter saído de uma condição de desuso para uma condição funcional sem o devido preparo da musculatura envolvida na imobilização pélvica, é possível que o grupo LAIP tenha tido comprometimento da síntese proteica resultante do período imobilizado, seguido de aumento na degradação resultante da locomoção, haja vista que não houve diferença na comparação LAIP e IR. Por outro lado, entende-se que o grupo submetido a FBM durante a imobilização pélvica (LDIP), apenas teve o tecido muscular preparado para o retorno da função, de modo que esse grupo foi submetido a eutanásia antes de retornar a função.

Já foi descrito que no tecido muscular de ratos idosos a FBM (830nm) apresentou resultados positivos no que se refere ao aumento da área total de secção transversal do músculo e aumento da maturação de células satélites em mioblastos e miotubos. Assim, no presente estudo é sugestivo o fato de que a FBM pode apresentar melhores resultados quando aplicada durante a fase de desuso, pelo que conforme descrito (Wen *et al.*, 2014), o incremento da razão proteína total/DNA é indicativo de aumento da área de secção transversal da fibra muscular.

No intuito de avaliar a resposta inflamatória nas diferentes condições experimentais no presente estudo, investigou-se as citocinas pró (IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10). Nesse sentido, sabe-se que as citocinas influenciam a atividade,

diferenciação, proliferação, sobrevivência das células imunológicas, bem como a regulação da produção e atividade de outras citocinas (Katharesan *et al.*, 2016).

Sabe-se que níveis reduzidos de IL-6 e TNF- α são favoráveis a ativação de células satélites e regeneração de miotubos, enquanto a produção cronicamente elevada tem sido associada a perda de massa muscular, uma vez que recente foi constatado que a maior morfometria muscular se deu pelo fato de que as citocinas pró-inflamatórias apresentaram-se reduzidas em ratos jovens (Oliveira *et al.*, 2011; Katharesan *et al.*, 2016). Dessa forma, deduz-se que a FBM por LLLT pode modular citocinas envolvidas na resposta inflamatória local e sistêmica (Souza & Silva, 2016).

Com atenção para as exposições citadas acima, no grupo IP os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α estiveram elevados em 27% e 5% respectivamente. Vale ressaltar que uma das funções dessas moléculas pró-inflamatórias estão relacionadas com o início e perpetuação da fase inflamatória da regeneração. Isso pode influenciar a geração de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, que atuam como mensageiros moleculares de sinalização celular e a depender da concentração podem ou não ser benéficos ao tecido afetado (Dinarello, 2011). No mesmo grupo (IP) os níveis de IL-10 estiveram elevados em 30%. O retorno da mobilidade (IR) favoreceu a redução das citocinas IL-6 e IL-10, mas estiveram acima dos valores do grupo C.

No que se refere aos grupos submetidos a FBM, constatou-se que durante a imobilização (LDIP) a concentração de IL-6 foi reduzida em relação a FBM após (LAIP). Ambos os grupos submetidos a FBM não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) do TNF- α comparado ao grupo C. A IL-10 mostrou-se elevada em 27% no grupo LDIP, o que revela redução da atividade pró-inflamatória e predominância da atividade anti-inflamatória, fato esse que evidencia a eficácia da FBM em modular citocinas pró e anti-inflamatórias, conforme já exposto em outros estudos (Oliveira *et al.*, 2011; Katharesan *et al.*, 2016).

No que se refere a modulação do processo inflamatório em condições de desordem musculoesquelética, a literatura apresenta consenso que a eficácia pode ser maior quando se utiliza doses acima de 4J, tanto para tecidos superficiais quanto para tecidos mais profundos, ao passo que para lesões do tecido muscular em caráter experimental as doses apresentadas variam de 4J a 10J (Souza & Silva 2016).

A metodologia apresentada no presente estudo é inédita e reflete uma problemática cada vez mais comum na prática clínica, que são as desordens pélvicas

causadas por fraturas, envelhecimento, pós-parto, repouso prolongado no leito, imobilização de grandes grupos musculares e outras formas que resultam em desequilíbrios na região pélvica.

Em resumo, a FBM não foi eficaz em reestabelecer as reservas glicogênicas da musculatura pélvica. Porém, a relação proteína total/DNA evidenciou que a FBM teve maior eficácia quando aplicada durante o processo de imobilização, resultado esse acompanhado de maior atividade anti-inflamatória evidenciada pela maior expressão de IL-10. No grupo LAIP houve predominância de atividade pró-inflamatória evidenciada por maior expressão de IL-6.

Possíveis desdobramentos do presente estudo podem se atentar a outras variáveis como, tempo de imobilização e de FBM, periodicidade, músculos a serem analisados, procedimentos de análises, faixas etárias, dosimetria da FBM, bem como outros recursos que possam ser favoráveis no processo de recuperação funcional da região pélvica.

Conclusão

Os resultados do presente estudo demonstram a importância em se levar em consideração o momento de iniciar a intervenção ainda na fase de imobilização, pelo que notou-se que a FBM durante a imobilização pode atenuar o catabolismo proteico e melhorar a resposta inflamatória, condições essas favoráveis a recuperação funcional em tempo reduzido.

Referências Bibliográficas

Allen DG, Lamb GD & Westerblad H. (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* **88**, 287–332.

Chowdhury P, Long A, Harris G, Soulsby ME & Dobretsov M. (2013). Animal model of simulated microgravity: a comparative study of hindlimb unloading via tail versus pelvic suspension. *Physiol Rep.* **1**, 1-11.

Dinarelo, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* **117**, 3720-3732.

Ferraresi C, de Sousa MV, Huang YY, Bagnato VS, Parizotto NA & Hamblin MR. (2015). Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci.* **30**, 1259-67.

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

Fitts RH, Riley DR & Widrick JJ. (2000). Physiology of a microgravity environment. Invited review: microgravity and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **89**, 823–839.

Foresto CS, Paula-Gomes S, Silveira WA, Graça FA, Kettelhut Ido C, Gonçalves DA & Mattiello-Sverzut AC. (2016). Morphological and molecular aspects of immobilization-induced muscle atrophy in rats at different stages of postnatal development: the role of autophagy. *J Appl Physiol* (1985). **121**, 646-660.

Frara N, Abdelmagid SM, Tytell M, Amin M, Popoff SN, Safadi FF & Barbe MF. (2016). Growth and repair factors, osteoactivin, matrix metalloproteinase and heat shock protein 72, increase with resolution of inflammation in musculotendinous tissues in a rat model of repetitive grasping. *BMC Musculoskelet Disord.* **18**, 17-34

Fritsch CG, Dornelles MP, Severo-Silveira L, Marques VB, Rosso IA & Baroni BM (2016). Effects of low-level laser therapy applied before or after plyometric exercise on muscle damage markers: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lasers Med Sci.* **31**, 1935-1942.

Giler KW & Myers A. (1965). An improved diphenylamine method for the stimulation of deoxyribonucleic acid. *Nature.* **206**, 93-99.

Glover EI, Phillips SM, Oates BR, Tang JE, Tarnopolsky MA, Selby A, et al (2008). Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *J Physiol.* **586**, 6049–6061.

Gordon BS, Kelleher AR & Kimball SR. (2013). Regulation of Muscle Protein Synthesis and the Effects of Catabolic States. *Int J Biochem Cell Biol.* **45**, 2147–2157.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition, National Academies Press (US), 2011.

- Guirro RRJ, Arruda EJ & Silva CA. (2014). Disuse induced by the spine rectification vest: experimental study. *Fisioter Pesqui.* **21**, 21-26.
- Katharesan V, Lewis MD, Vink R & Johnson IP. (2016). Disparate Changes in Plasma and Brainstem Cytokine Levels in Adult and Ageing Rats Associated with Age-Related Changes in Facial Motor Neuron Number, Snout Muscle Morphology, and Exploratory Behavior. *Front Neurol.* **7**, 7:191.
- Lamboley CR, Wyckelsma VL, Perry BD, McKenna MJ & Lamb GD. (2016). Effect of 23-day muscle disuse on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ properties and contractility in human type I and type II skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol (1985).* **121**, 483-92.
- Leal EC Junior, Lopes-Martins RA, de Almeida P, Ramos L, Iversen VV & Bjordal JM. (2010). Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol.* **108**, 1083–8.
- Li TS, Shi H, Wang L & Yan C. (2016). Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Satellite Cell Proliferation and Apoptosis in Immobilization-Induced Muscle Atrophy in Rats. *Med Sci Monit.* **29**, 4651-4660.
- Macedo AB, Moraes LHR, Mizobuti DS, et al (2015). Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. *PLoS ONE.* **10**, 1-14.
- Mukai R, Horikawa H, Lin PY, Tsukumo N, Nikawa T, Kawamura T, Nemoto H & Terao J. (2016). 8-Prenylnaringenin promotes recovery from immobilization-induced disuse muscle atrophy through activation of the Akt phosphorylation pathway in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **311**, 1022-1031.
- Mukai R, Matsui N, Fujikura Y, Matsumoto N, Hou DX, Kanzaki N, Shibata H, Horikawa M, Iwasa K, Hirasaka K, Nikawa T & Terao J. (2016). Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice. *J Nutr Biochem.* **31**, 67-76.
- Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M & Yoshimura T. (2009). Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* **94**, 1005–1015.
- Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR & Salomão R. (2011). Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol.* **61**, 255-265
- Powers SK, Lynch GS, Murphy KT, Reid MB & Zijdewind I. (2016). Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue. *Med Sci Sports Exerc.* **48**, 2307-2319.
- Rudrappa SS, Wilkinson DJ, Greenhaff PL, Smith K, Idris I & Atherton PJ. (2016). Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. *Front Physiol.* **25**, 7-361.
- Silva CA, Guirro RR, Delfino GB & Arruda EJ. (2012). Proposal of non-invasive experimental model to induce scoliosis in rats. *Rev Bras Fisioter.* **16**, 254-60.

Siu LO, Russell JC & Taylor AW. (1970). Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology Published*. **28**, 234-236.

Souza MV & Silva MO. (2016). Laser therapy on locomotor disorders: a systematic review of experimental studies. *Rev Bras Med Esporte*. **22**, 76-82.

Stokes IA, McBride CA & Aronsson DD. (2008). Intervertebral disc changes in an animal model representing altered mechanics in scoliosis. *Stud Health Technol Inform*. **140**, 273-7.

Wen C, Chen Y, Wu P, Wang T & Zhou Y. (2014). MSTN mTOR and FoxO4 are involved in the enhancement of breast muscle growth by methionine in broilers with lower hatching weight. *PLoS One*. **9**, 1-11.

Yoshida S, Matsuzaki T & Hosono M. (2016). An immunohistochemical study of the sciatic nerve in a rat knee immobilization model. *J Phys Ther Sci*. **28**, 1116-9.

TERCEIRA PARTE

Considerações Finais

Limitações do estudo

Perspectivas Futuras

Anexos

5. Considerações Finais

5. Considerações Finais

Com base nas condições experimentais que compõe a presente tese, com destaque para os resultados expostos, é possível apresentar as seguintes considerações:

O estudo I elucidou os anestésicos tiopental e tribromoetanol como sendo os que menos interferem no metabolismo da glicose, de modo que esses dois anestésicos foram as opções a serem utilizadas durante os testes de materiais e biomecânicos para desenvolvimento do modelo de imobilização pélvica;

O estudo II teve êxito em expor um modelo de imobilização pélvica que mimetiza as condições catabólicas encontradas no desuso. Um dos principais diferenciais desse modelo é o número de músculos envolvidos pela imobilização, sendo sugestivo que esse tipo de imobilização pode apresentar maior severidade no que se refere ao desuso muscular.

O estudo III chama a atenção para a falta de estudos sobre fotobiomodulação em condições de desuso muscular. Assim foi possível constatar que o *laser* (λ 830 nm) durante o período de desuso pode ser uma importante estratégia para atenuar o catabolismo e favorecer a recuperação funcional.

6. Limitações do estudo

6. Limitações do estudo

O *estudo I* que avaliou a resposta glicêmica mediante uso de diferentes anestésicos, poderia apresentar maior clareza com dados relativos a temperatura dos animais durante o tempo de anestesia, exposição do tempo em que os animais estiveram sob anestesia no que se refere a dose/efeito, além de uma análise eletrocardiográfica sob as diferentes condições anestésicas. O índice HOMA poderia clarificar a implantação do quadro de resistência à insulina que classicamente acompanha a implantação de atrofia muscular.

Por se tratar de um estudo de desenvolvimento de modelo experimental, o *estudo II* poderia ser reforçado por um teste deambulação tipo open field que indicaria a capacidade de exploração que reflete o retorno das dinâmicas funcionais, além de uma análise histopatológica da musculatura envolvida na imobilização. Seria interessante submeter a coluna do animal a um ensaio de tração, para avaliar a possível influência da restrição. Em se tratando de esclarecer as vias envolvidas na relação síntese/degradação proteica poderiam ser analisadas as proteínas-chave da via mTOR, como RAG A GTPase, ERK/MAP4K3, PKB/Akt, mTOR, p70S6K1, Jnk, IRS-1, STAT3, e STAT6 ou o sistema ubiquitina-proteossomo.

Para avaliar o grau de ansiedade os animais ainda poderiam ser submetidos ao labirinto em cruz elevado. Dentro do perfil mais primoroso de análise molecular poderia ter acompanhado vias citosólicas que indicam a relação entre a síntese e a degradação proteica, contexto que poderia ser ampliado. O estudo III poderia contar com mais um grupo submetido a LLLT durante e após o tempo de realização total dos estudos, já que o tempo máximo da aplicação da LLLT foi de 7 dias durante ou 7 dias após a imobilização. Uma análise do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) poderia indicar a efetividade da LLLT na recuperação da atrofia, já que trata-se de um importante fator de crescimento muscular. Esse estudo poderia ainda se atentar para a determinação da área de secção transversa, tipos de fibra e razão capilar por fibra muscular esquelética.

Por fim, é importante destacar que durante o desenvolvimento da presente tese, a conjuntura econômica do país exigiu adequações orçamentárias diante da falta de fomento para análises mais primorosas. Cabe ressaltar que por ser um modelo/estudo inédito, abre-se novos caminhos e oportunidades para estudos de relevância para a comunidade Fisioterapêutica.

7. Perspectivas futuras

7. Perspectivas futuras

O modelo não invasivo de imobilização pélvica, bem como a FBM poderiam ser estudados considerando variáveis como tempo de imobilização e tratamento, idade dos animais, tipos de análises, comparações de diferentes parâmetros da FBM, além da combinação de técnicas.

Anexo A

CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO MANUSCRITO I

11/12/2016

Gmail - [JOACP]:Acknowledgment of Online Submission



Eder João <ftederarruda@gmail.com>

[JOACP]:Acknowledgment of Online Submission

6 mensagens

Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology <editorjoacp@gmail.com>
 Responder a: editorjoacp@gmail.com
 Para: ftederarruda@gmail.com

5 de agosto de 2016 18:17

If you cannot see this page properly, please [click here](#).

Dear Mr. De aruda,

Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology has received your manuscript entitled "GLUCOSE METABOLISM ALTERATION UNDER DIFFERENT ANESTHETICS: STUDY IN RATS" for consideration for publication. The reference number for this manuscript is "JOACP_247_16". Kindly quote this in correspondence related to this manuscript.

The manuscript is being reviewed for possible publication with the understanding that it is being submitted to one journal at a time and have not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere either as a whole or in part. Online submission of this article implies that the corresponding author has the written consent from all the contributors to act as corresponding author.

You are requested to send the signed copyright/contributor form within two weeks. The form can be uploaded as an scanned image from your area. The decision about the manuscript will be conveyed only on receipt of the form. High resolution images are required at the time of acceptance, you should be notified separately for the same, if images uploaded by you are not of printable quality.

The Editors will review the submitted manuscript initially. If found suitable, it will follow a double-blinded peer review. We aim to finish this review process within a short time frame, at the end of which a decision on the suitability or otherwise of the manuscript will be conveyed to you via this system. During this process you are free to check the progress of the manuscript through various phases from our online manuscript processing site <http://www.journalonweb.com/joacp>.

The journal allows free access (Open Access) to its contents and permits authors to self-archive final accepted version of the articles on any OAI-compliant institutional / subject-based repository. The journal does not charge for submission, processing or publication of manuscripts and except for color reproduction of photographs.

We thank you for submitting your valuable work to the Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology.

Yours sincerely,
 Anju Grewal
 Editor
 Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology

Message sent on Friday, August 05, 2016

Please add editorjoacp@gmail.com as a contact in your E-mail client to ensure that this mail is not considered as a junk mail.

--- END OF MESSAGE ---Authors are advised to become members of the Research Society of Anaesthesiology Clinical Pharmacology. Pdf download of articles will soon be on paid basis for non-members. For membership application forms please see print version of the journal or email at editorjoacp@gmail.com

Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology <editorjoacp@gmail.com>
 Responder a: editorjoacp@gmail.com
 Para: ftederarruda@gmail.com

5 de agosto de 2016 18:17

https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=e7db0420e4&view=pt&q=JOACP_247_16&qs=true&search=query&th=1565bb567f100322&siml=1565bb567f10... 1/4

Anexo B

CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO MANUSCRITO II

11/12/2016

Gmail - Your co-authored submission



Eder João <federarruda@gmail.com>

Your co-authored submission

1 mensagem

PM&R <EvisSupport@elsevier.com>
Responder a: support@elsevier.com
Para: federarruda@gmail.com

5 de novembro de 2016 01:37

Dear Mr. Arruda,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: PM&R

Title: Proposal of a non-invasive pelvic immobilization model: study in rats.

Corresponding Author: Rafaela Ferreira

Co-Authors: Eder João Arruda, Carlos Alberto Silva, Nivaldo Parizotto

Rafaela Ferreira submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=PMRJOURNAL

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at rafaelabf.fisio@hotmail.com.

Thank you,
PM&R**This message was sent automatically. Please do not reply**

Anexo C

CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO MANUSCRITO III

23/01/2017

Gmail - EP-RP-2017-086282 Receipt of New Paper by Experimental Physiology



Eder João <federarruda@gmail.com>

EP-RP-2017-086282 Receipt of New Paper by Experimental Physiology

1 mensagem

Experimental Physiology <ephjournal@physoc.org>
 Responder a: ephjournal@physoc.org
 Para: federarruda@gmail.com

23 de janeiro de 2017 13:19

Dear Dr Arruda,

This is a message to all authors listed on the Research paper submitted to Experimental Physiology on 23-Jan-2017.

"Influence of low-level laser therapy (830nm) on muscle metabolism and cytokine concentration during and after pelvic immobilization: study in rats," by Eder João Arruda, Carlos Alberto Silva, Rafaela Ferreira, and Nivaldo Antonio Parizotto.

Your manuscript has been assigned the Paper #: EP-RP-2017-086282.

The corresponding author has confirmed that all listed authors have

- provided written authorization to submit the paper to Experimental Physiology on their behalf and have confirmed that they are listed correctly.
- agreed to be accountable for all aspects of the work
- contributed significantly to drafting the work or revising it critically for important intellectual content.
- contributed substantially to either the Conception or design of the work or the Acquisition or analysis or interpretation of data for the work

The following Warranties have been provided by the corresponding author on behalf of all authors:

- the Article is an original work, has not been published before and is not being considered for publication elsewhere in its final form either in printed or electronic format.
 - Permission has been obtained from the copyright holder to reproduce in the Article (in all media including print and electronic form) material not owned by yourselves, and that you have acknowledged the source.
 - the article contains no violation of any existing copyright or other third party right or any material of an obscene, indecent, libellous or otherwise unlawful nature and that to the best of your knowledge this Article does not infringe the rights of others.
 - any formula or dosage given is accurate and will not if properly followed injure any person.
 - the experiments in this manuscript comply with The Society's policies regarding Animal Experiments and Human Experiments. (hyperlink) <http://physoc.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal-policies.html>
- Compliance with these policies is demonstrated in the Methods section.
- If the article is accepted the authors will agree to the journal's Exclusive licence Agreement. http://www.physoc.org/sites/default/files/exclusiveliicenseagreement_0.pdf

Please click on the link below to check the details of this manuscript .

<https://ep.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?e=A5JT7cC7A6Fn4F3A9fdnG5oDnQEijuDa5Toa0ERWwZ>

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=e7db0420e4&view=pt&search=inbox&th=159cbe91d631b433&siml=159cbe91d631b433>

1/2

You may need to update your profile first. <https://ep.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?e=A7JT5cC3A3Fn1a7A9fdmkYU8gJ0ptUykDaQgsoCgZ>

We recommend that you provide an 'ORCID' unique identifying number with your author profile so that, if published, this research will be linked to your ORCID record. See further information on ORCID at <http://orcid.org/>

If the warranties and manuscript details provided are correct, there is no need for you to take any action. All future communication between Experimental Physiology and the authors will be made via the Corresponding Author.

If you DO NOT recognise this submission, should not be listed as an author of this paper, have not approved the final submitted version, or have any other concerns regarding the warranties provided on your behalf or any other matters, please contact Experimental Physiology immediately ephjournal@physoc.org quoting the manuscript reference number above.

The manuscript will now be reviewed.

For further information on our review process, please see:

http://ep.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?form_type=display_rev_instructions

Best wishes,

Experimental Physiology
ephjournal@physoc.org

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=e7db0420e4&view=pt&search=inbox&th=159cbe91d631b433&siml=159cbe91d631b433>

Anexo D

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL - *ESTUDO I*

Universidade Metodista de Piracicaba
Comissão de Ética no Uso de Animais



Piracicaba, 12 de março de 2015.

De: Comissão de Ética no Uso de Animais

Ref.: Aprovação de Projeto de Pesquisa

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba **APROVOU** o desenvolvimento do Projeto de estudo direcionado a avaliação das curvas glicêmicas e sensibilidade à insulina frente a diferentes anestésicos: Estudo em ratos, o que se vincula ao Projeto mãe protocolo nº 09/2014, analisado por esta comissão.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carlos Alberto da Silva', is written in a cursive style.

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

Anexo E

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL - *ESTUDO II e III*

Piracicaba, 18 de Junho de 2014.

Para: Prof^o Dr. Carlos Alberto da Silva
De: Comissão de Ética no Uso de Animais
Ref.: Aprovação de Projeto de Pesquisa

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba APROVOU o Projeto: "*Desenvolvimento de dispositivo ortótico para estudo da imobilização pélvica em ratos*" analisado por esta comissão sob o protocolo nº 05/2014.

Atenciosamente,



Profa. Patrícia Carla Paulino Belotto
Comissão de Ética no uso de Animais

Apêndice

ESTUDOS TRADUZIDOS PARA A LINGUA INGLESA

Estudo – I

GLUCOSE METABOLISM ALTERATION UNDER DIFFERENT ANESTHETICS: STUDY IN RATS

Submetido: “*Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*”, em 05 de Agosto de 2016, sob a
referência nº - OACP_247_16

GLUCOSE METABOLISM ALTERATION UNDER DIFFERENT ANESTHETICS: STUDY IN RATS

Eder João de Arruda^a, Carlos Alberto da Silva^b, Nivaldo Antonio Parizotto^c.

- d. PhD Student in Physiotherapy – UFSCar – ftederarruda@gmail.com
- e. Professor of the Post-graduation Program in Physiotherapy – UNIMEP – casilva@unimep.br
- f. Professor of the Post-graduation Program in Physiotherapy – UFSCar – nivaldoaparizotto@hotmail.com

Adresses

UNIMEP - Rodovia do Açúcar, km 156 (SP-308)

CEP. 13.423-170 - Piracicaba, SP - Brazil

UFSCar - Rodovia Washington Luis, Km 235 (SP 310). Jd Guanabara, São Carlos – SP. CEP 13.565-905 – Brazil.

GLUCOSE METABOLISM ALTERATION UNDER DIFFERENT ANESTHETICS

Correspondent author

Eder João de Arruda

ftederarruda@gmail.com

+55 19 9 9761 5276

Abstract

Anesthesia, sedation and euthanasia procedures are indispensable for experimental studies with animals, so that anesthetics investigations may favor the reduction of metabolic interferences in the final results and reduce the risk of unintentional death. The study objective was to elucidate the influences on glucose metabolism under different anesthetics. The animals (32 male Wistar rats, aged 3 to 4 months and weight of 250 ± 50 g) were divided into eight groups (n=4) and then the groups were subdivided into two groups. Anesthetics: sodium thiopental (T, 40 mg / kg body weight), Zolazepan (Z, 50 mg / kg body weight), Ketamine-xylazine (KX, 35 mg / kg body weight and 4 mg / kg body weight) and tribromoethanol (TRI, 250mg / kg body weight). The metabolic assessment was: glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT). The recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals were followed. Statistical analysis: Shapiro-Wilk normality test, ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$. The GTT showed that anesthetics Z and KR combination led to an increase of 16% and 41.6% compared to the T. There was no

difference between T and TRI. Regarding to the ITT, it was noted that the anesthetic Z and KR combination reduced the captation of glucose by 27.2% and 41.8% respectively. It was not observed changes in TRI group compared to T. In conclusion Anesthetic Z and KR altered mechanisms involved in glycemetic control, and the anesthetic thiopental and tribromoethanol did not interfere in glycemetic control dynamics.

Key words: anesthesia, rats, metabolism, glycemetic.

INTRODUCTION

In a great part of the studies developed with animals, anesthesia/sedation is used for procedures or euthanasia¹. In the intention of minimizing interferences in the glucose metabolism, the choice of the anesthetic deserves attention due to the fact that factors such as: size, species, age, nutritional status, body and environment temperature, level of stress, hemodynamics, metabolism and other factors might influence the organism's answer to the anesthetic.^{2,3,4}

Many are the variables that influence anesthesia. The variety of available anesthetics in the market inevitably exposes the studies to methodological and bioethical questionings, whereas the most assertive choice may attenuate and/or avoid unwanted alterations caused by anesthesia. In this context, it is more than necessary that there is effort from society and the scientific community in the research for more dignified and safe strategies for experimental research.^{1,5}

In general, anesthesia/sedation procedures might trigger unwanted alterations, especially hypothermia and alteration in glucose metabolism, while this may result in non-intentional death of the animals. The direct depression of the thermoregulatory center may be still more critical when accompanied by alterations in glucose metabolism. Even though there might be equipment for the hemodynamics monitoring, mechanical ventilators and other technological resources to reduce sample loss, the high cost makes the acquisition impracticable.^{2,6,7}

An anesthetic status might indirectly trigger a hypercatabolic state, with elevated plasmatic concentrations of hormones with catabolic activity like cortisol, glucagon, and catecholamine, in addition to the release of trophic hormones by the hypothalamus, which stimulate the release by the hypophysis of adrenocorticotropic hormone (ACTH), growth hormone, prolactin, endorphins and antidiuretic hormone (ADH). Consequently, there is decrease or altered release of the anabolic hormones, insulin and testosterone⁸.

Both in the clinical and experimental settings, for decades, scientists have engaged in the investigation of anesthetic strategies that show the smallest interference possible in the glucose metabolism, which in turn, in different anesthesia conditions, may trigger medical conditions of glucose intolerance and/or insulin resistance, in addition to triggering other catabolic alterations of endocrine background, such

as the increase in cortisol and epinephrine. The existence of endocrine disorders elevates the intervention risks considerably.

Different parameters such as blood pressure, temperature, cardiac ultrasound, oxygenation, electrocardiography and others are shown as monitoring forms of the animals in anesthesia¹. However, studies that highlight the energetic metabolism are necessary, seen that glycemic profile alterations occur with greater frequency and, in general, might be incompatible with life, a fact that may result in unintentional death of the animals in experimentation condition.¹¹

It is necessary to search parameters that improve experimental control, for that also favors the reliability of the experimental results. In the meantime, the drugs sodium thiopental, ketamine-xylazine, zolazepan e tribromoethanol are largely utilized for anesthesia, sedation and euthanasia in published studies in magazines of great impact factor.¹

In order to elucidate possible anesthetic influences in the glucose metabolism, the present study aimed to evaluate glucose tolerance, as well as insulin tolerance of rats submitted to four different anesthetics.

METHOD

The present study was approved by the Ethics committee in animal experimenting of UFSCar under protocol 11/2006 and followed rigorously the ethical and laboratorial principles established in the eighth edition of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011).

Forty (40) male rats of the Wistar (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*) lineage, with age from 3 to 4 months, and weight 250 ± 50 g were part of the study. The experimental groups (n=10) were structured in: Sodium Thiopental (T) 40 mg/kg, Zolazepan (Z) 50 mg/kg, Ketamine-Xylazine (KX) 35 mg/kg e 4 mg/kg and Tribromoethanol (TRI) 250 mg/kg. Each group was subdivided in five animals submitted to the glucose tolerance test (GTT) and other five submitted insulin tolerance test (ITT).

Through randomization and distinction of the experimental groups, a 48-hour recommended period was respected, with the goal of minimizing possible anxiolytic and behavior alterations in the animals.³

For the anesthesia procedure, the intraperitoneal (ip) or intramuscular (im) routes were used, as the manufacturing laboratories of each anesthetic recommend. In the ip route, the anesthetic was injected half centimeter to the left of the linea alba. Through the im route, the substance was injected in the lateral region of the right posterior paw. For both the ip and im routes, the hypodermic 25G 1" 25 X 5 needle was used.

Insulin tolerance test (ITT)

For the ITT realization, the rats were anaesthetized and, after 10 minutes of anesthetic induction, a cut in the tail of the animal was performed from where an aliquot of blood was collected and the blood glucose level evaluated through a tape used in glucotest, determining thus the time zero. Sequentially to the administration of insulin (2 U/kg/ip – Biohulin), the blood collection was performed at times 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min and 30 min and the blood glucose level was again evaluated.^{12, 13}

Glucose tolerance test (GTT)

For the evaluation of the GTT, the animals were anaesthetized and, after 10 minutes of anesthetic induction, a cut in the tail of the animal was performed from where an aliquot of blood was collected and the blood glucose level evaluated through a tape used in glucotest, determining thus the time zero. Hereafter,

glucose was administered (2 g/Kg/ip), followed by blood collection in the times 15 min, 30 min, 60 min, 90 min and 120 min and the blood glucose level was again evaluated. Since the analysis time is pre-determined in 120 min, the results show the amount of glucose mobilized in this period.^{12,13}

It is convenient to highlight that, by applying the anesthetic, the 10 minutes time was respected so that there was suppression of the central answers and consequent anesthesia. This waiting time before initiating invasive procedures in experimentation animals has been consensual in impact publications.¹

Statistical analysis

The statistical analysis was performed through the Shapiro-Wilk test for normality, followed by the application of the analysis of variance ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$. The decay speed was calculated through the software ORIGIN® (version 5.0.).

RESULTS

Initially, the baseline glucose was evaluated under four different anesthetics, used in animal testing. From the glycemic profile, it was observed that the anesthetics thiopental (T) and zolazepan (Z) presented values considered ideal. The groups anesthetized by tribromoethanol (TRI), and by the Ketamine/Xylazine (KX) combination, showed increased blood glucose level by 17% and 26%, respectively, when compared to T, as can be seen in Table 1.

Table 1. Blood glucose levels immediately after anesthesia. The values are expressed in average \pm sem, with $p < 0,05^*$ compared to thiopental.

Anesthetic	Baseline blood glucose mg/dL
Thiopental	94,5 \pm 5
Zolazepan	95,2 \pm 3
Ketamine/Xylazine	126,5 \pm 7*
Tribromoethanol	112,2 \pm 2*

Thereafter, the animals were subjected to the glucose tolerance test, under effect of different anesthetics, as described in Table 2. As an indication of reduction in the secretory activity of insulin, it was found that zolazepan showed an increase in area under the curve by 16%, compared to T. The ketamine/xylazine combination showed an increase in area under the curve by 41.6% and 17%, compared to T and Z, respectively, which indicates a reduction in responsiveness of pancreatic β cells to glucose. Additionally, tribromoethanol did not differ from thiopental.

Table 2: Area under the curve after glucose tolerance test (GTT, mg/dL/120 min) in rats subjected to four types of anesthesia: thiopental (T, 40 mg/Kg); zolazepan (Z, 50 mg/Kg); ketamine-xylazine (KX, 35 mg/kg and 4 mg/kg); tribromoethanol (TRI, 250mg/Kg). The values are expressed in average \pm sem, n=5. p<0,05*, compared to T and p<0,05# compared to Z.

Anesthetic	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	average \pm sem
Thiopental - mg/dl	600	620	590	610	620	608 \pm 10
Zolazepan - mg/dl	700	730	670	730	700	706 \pm 19*
Ketamine/Xylazine - mg/dl	850	900	800	850	830	846 \pm 25*.#
Tribromoethanol - mg/dl	650	710	610	660	630	648 \pm 31

In order to identify the responsiveness of peripheral tissues, the insulin tolerance test was performed, which expresses results in decay constant. The data set showed that anesthetics T ($5.6 \pm 0:21$) and TRI ($6.1 \pm 0:23$) did not promote significant changes in peripheral tissue insulin sensitivity. On the other hand, the decay constant of anesthetic Z ($3.9 \pm 0:24$) showed delay of 27.2%, compared to T (p <0.05*). More severely, the KX combination decay constant ($3.1 \pm 0:23$) showed 41.8% reduction, compared to T, and 20% compared to Z, as can be seen in figure 3.

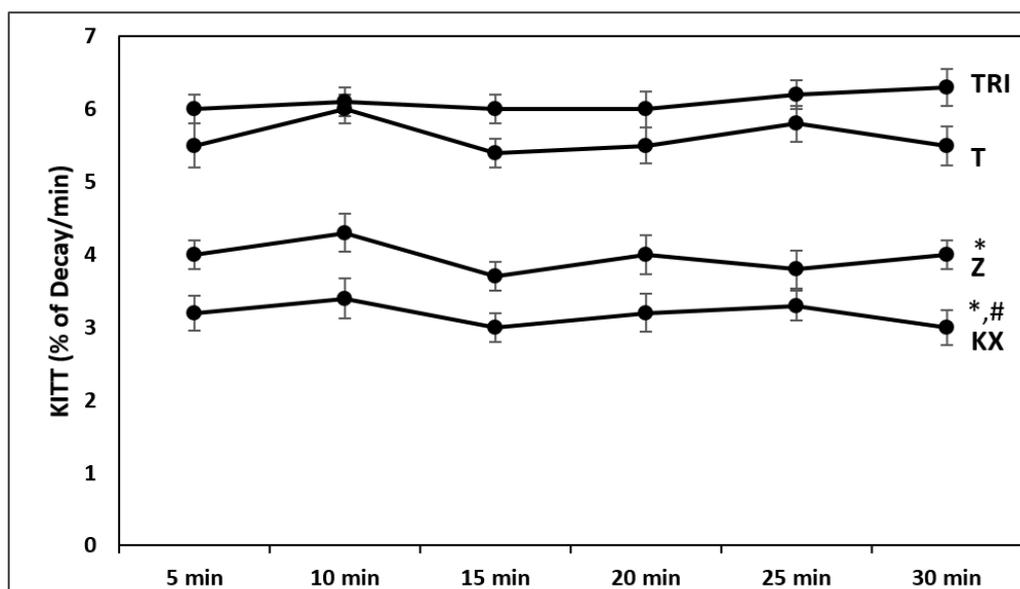


Figure 3. Decay constant of glucose (KITT; % min) of rats subjected to anesthesia by: thiopental (T, 40mg/Kg); zolazepan (Z, 50mg/Kg); Ketamine-Xylazine (KX, 35 mg/kg weight and 4 mg/kg) and tribromoethanol (TRI, 250mg/Kg). The values are expressed in average \pm sem, n=5. p<0,05*, compared to T, and p<0,05# compared to Z.

DISCUSSION

Metabolic assessments should be linked to the constant search for improvement of parameters that can indirectly alter the conditions and dynamics of functional balance. The present aimed the analysis of insulin responsiveness of peripheral tissues, and the insulin secretory process.

The variety of anesthetics available and used in experimental studies has been significant, primarily for use in anesthesia/sedation or euthanasia procedures. Considering this, a systematic review showed that studies published in relevant journals have insufficient information on anesthesia/sedation and euthanasia procedures. This can result in significant variations in results from a same methodology. The present study additionally draws attention to standardization efforts for comparison purposes.¹

The sensitivity of insulin target tissues is the result of fine control of plasma concentrations of the main energy substrates. In this context, pancreatic β cells adjust the insulin secretion dynamic, according to the circulating substrate concentration.⁶

The glucose tolerance test (GTT), applied to evaluate secretory behavior of the pancreatic β cell, elucidated that the predominant chemo-metabolic response, in the presence of different anesthetics, showed an increase of area under the curve of zolazepan, in relation to thiopental and tribromoethanol. Increase for ketamine-xylazine combination was even more significant. These results deserve attention due do the fact that they indicate impact in the activation of pancreatic beta (β) cells that had not answered efficiently before the glucose load, which suggests interference of the mentioned drugs in functional balance of β cells. Thiopental and tribromoethanol showed no interference.

Within the pharmacological actions of zolazepan, there is stimulation of adrenergic α_2 receptors on pancreatic beta cells, which inhibit insulin secretion^{14,15}. Although the action of this molecule occurs in lower intensity, compared to the intensity observed in the presence of ketamine-xylazine combination, there are possibly different degrees of sensitivity of adrenergic α_2 receptor to molecules used in anesthesia.

Regarding thiopental, this barbiturate both blocks the channels of K^+ modulated by the relationship ATP/ADP, and increases the activity of calcium mobilizing pathways in the cytosol, which are linked to inositol trisphosphate, depolarizing the β cell and enhancing insulin secretory process^{16,17}. In this analysis it was found that, in the presence of thiopental, responsiveness of the β cells to the glucose bolus followed a similar profile to that described by other authors, so that the values of this study corroborate with values considered standard for the species.¹⁸

A study showed that thiopental has direct influence on membrane depolarization of pancreatic islets. This suggests that stimulation of insulin secretion occurs regardless of the presence of blood glucose, since the molecular structure of the anesthetic is similar to ATP.¹⁹ This similarity with ATP possibly mimics energy substrate maintenance, which can reduce metabolic instability and unintended deaths from hypothermia.⁷

It has been described that Ketamine used alone, i.e., without being associated with other drug, does not alter the plasma concentrations of insulin or glucose. Studies indicate that Ketamine does not promote muscle relaxation, which is why it is generally used in combination with other drugs.²⁰

Among the combinations present in cocktails applied in anesthesia, an example is the combination of xylazine and ketamine, which induces analgesia and muscle relaxation. Xylazine is a drug that promotes

changes in carbohydrate metabolism and reduction of insulin, which are important factors to consider in experimentation²¹. This confirms the changes in peripheral sensitivity to insulin, represented by reduction in peripheral glucose uptake rate in the animals under anesthesia with the set of drugs.

It is worth mentioning that xylazine is an α -adrenergic agonist, which stimulates α -2 receptors in pancreatic islets, reducing the secretory process of insulin, fact which is represented in the present study by the largest area under the curve in the glucose tolerance test, under anesthesia by these drugs associated.

In order to elucidate the responsiveness behavior of peripheral tissues, the insulin tolerance test was performed. The test showed homeostasis in insulin dynamics by anesthetic action of thiopental and tribromoethanol. There was also a significant reduction in the blood glucose decay constant, under anesthesia with zolazepan and the ketamine-xylazine combination, indicating that these drugs compromise insulin sensitivity of peripheral tissues.

Based on the above mentioned information, it is suggestive that there is a complication in the hexose uptake system, a fact that confirms other results²², where it was described that the ketamine-xylazine combination weakens the secretory responsiveness of insulin, on its central role in glycemic control. The study also points out that this option of anesthetic should only be selected if it does not interfere with the experimental analysis profile.

From the data presented in this study, it is possible to suggest that thiopental and tribromoethanol are safe with respect to glucose metabolism, given that glucose was maintained within normal parameters, the area under the curve of TWG showed variation within the stipulated response time for the species, and the percentage of decay of ITT suggests that there was no complication of insulin signaling pathways. Studies that follow the scope of glucose metabolism, and other studies that seek to minimize interference, should be watchful to the choice of anesthetic.

Although this study has shown significant changes in glucose metabolism, no unintentional death of animals has happened, given that recommendations of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* were strictly followed, as well as the drug dosage recommendations from the laboratories.

CONCLUSION

Referring to possible metabolic interferences, the anesthetics thiopental and tribromoethanol showed no significant interference in the dynamics of glucose metabolism. On the other hand, zolazepan and the ketamine-xylazine combination deserve attention due to changes observed for both glucose uptake, as well as for insulin secretion.

Bibliography

26. Matfield M. The ethics of animal research. *Exp Anim* 1996; 45(3):209-15.

27. Silva CA, Souza MZ, Luciano E, Arruda EJ, Grassi DO. Utilization of neuromuscular electric stimulation in the acute phase of ankle immobilization at 90°: Study in rats. *Journal of Chinese clinical medicine* 2009; 4: 249-257.
28. Russel WMS, Burch RL, editores. *The principle of human experimental technique*. London: Methuenl, 1959.
29. Uhlig C, Krause H, Koch T, Gama de Abreu M, Spieth PM. Anesthesia and Monitoring in Small Laboratory Mammals Used in Anesthesiology, Respiratory and Critical Care Research: A Systematic Review on the Current Reporting in Top-10 Impact Factor Ranked Journals. *Plos one* 2015; 10(8).
30. Yatabe T, Kawano T, Yamashita K, Yokoyama M. Preoperative carbohydrate-rich beverage reduces hypothermia during general anesthesia in rats. *J Anesth* 2011; 25: 558–562.
31. Arruda EJ, Kitamura JH, Chaves TP, Silva CA, Mascarim, AL. Comportamento Exploratório e Ansiolítico de Ratos e Ratas Submetidos à Estimulação Somatossensorial. *Rev Bras Terap e Saúde* 2011; 2(1):7-12.
32. Sharp PS, Shaw K, Boorman L, Harris S, Kennerley AJ, Azzouz M, Berwick J. Comparison of stimulus-evoked cerebral hemodynamics in the awake mouse and under a novel anesthetic regime. *Sci Rep* 2015; 5:12621.
33. Bara M, Joffe AR. The ethical dimension in published animal research in critical care: The public face of science. *Crit Care* 2014; 18: R15.
34. Silva CA, Guirro RRJ, Forti F. Tiopental Bloqueia os Canais de K⁺ ATP nas Células β Pancreáticas. *Rev. Ciênc. Méd* 2005; 14(1): 33-42.
35. Boyko M, Kuts R, Gruenbaum BF, et al. The role of hypothermia in the regulation of blood glutamate levels in naive rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2013; 25: 174–183.
36. Cheibub ZB. Endocrine responses to anesthesia. *Rev Bras de Anesthesiol* 1991; 41(5): 357-363.
37. Diltser M, Camu F. Glucose homeostasis and insulin secretion during isoflurane anesthesia in humans. *Anesthesiology* 1988; 68: 880-886.
38. Maciel RT, Fernandes FC, Pereira LS. Anesthesia in a patient with multiple endocrine abnormalities: case report. *Rev. Bras. Anesthesiol* 2008; 58(2): 172-178.
39. Zuurbier CJ, Keijzers PJ, Koeman A, Van Wezel HB, Hollmann MW. Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats. *AnesthAnalg*. 2008; 106(1): 135-42;
40. Rafacho A, Roma LP, Tabaga SR, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 536-45.

41. Schossler JE, Schossler DR. Avaliação clínica da anestesia geral pela tiletamina-zolazepam associada ao fentanil em ratos. *Acta Cir Bras* 1993; 8(1): 32-4.
42. Polydoro AS, Natalini CC, Wallau JEW, Hennemann CRA, Cassol DS, Futema F. Cardiopulmonary alterations with romifidine, tiletamine/zalazepam and halothane in horses. *Cienc. Rural* 1997; 27 (2): 249 - 257.
43. Drews G, Krippeit-drews P, Düfer M. Electrophysiology of islet cells. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 654: 115-63.
44. Qiang DH, Xu YF, Sun JP, et al. Thiopental-induced insulin secretion via activation of IP3-sensitive calcium stores in rat pancreatic beta cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 30: 2112 – 2115.
45. Lindborg KA, Stephan jacob S, Henriksen EJ. Effects of Chronic Antagonism of Endocannabinoid-1 Receptors on Glucose Tolerance and Insulin Action in Skeletal Muscles of Lean and Obese Zucker Rats. *Cardiorenal Med* 2011; 1(1): 31–44.
46. Silva CA, Guirro RRJ, Forti F. Tiopental Bloqueia os Canais de K⁺ ATP nas Células β Pancreáticas. *Rev. Ciênc. Méd* 2005; 14(1): 33-42.
47. Norton WB, Scavizzi F, Smith CN, Dong W, Raspa M, Parker-Thornburg JV. Refinements for embryo implantation surgery in the mouse: comparison of injectable and inhalant anesthetics - tribromoethanol, ketamine and isoflurane - on pregnancy and pup survival. *Lab Anim.* 2015; 12.
48. Beckman B. Anesthesia and pain management for small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013; 43: 669–688.
49. Kobayashi H, Kato H, Hirabayashi Y, Murakami H, Suzuki H. Modulations of Muscle Protein Metabolism by Branched-Chain Amino Acids in Normal and Muscle-Atrophying Rats. *J. Nutr* 2006; 136: 234S-236S.

Estudo – II

Proposal of a non-invasive pelvic immobilization model: study in rats.

Submetido: “*PM & R (PHILADELPHIA,2009): The Jornal Of Injury, Function And Rehabilitation*”, em 05 de Novembro de 2016, sob a referência nº -
PMRJOURNAL_2016_36

Proposal of a non-invasive pelvic immobilization model: study in rats.

Non-invasive pelvic immobilization model

Eder João de Arruda¹, Carlos Alberto da Silva², Rafaela Ferreira³, Nivaldo Antonio Parizotto⁴.

1 – PhD Student in Physiotherapy – UFSCar (Federal University of São Carlos)

2 – Professor of the Post-graduation Program in Physiotherapy – UNIMEP (Methodist University of Piracicaba)

3 – Master degree in Physiotherapy – Unimep (Methodist University of Piracicaba)

4 – Professor of the Post-graduation Program in Physiotherapy – UFSCar (Federal University of São Carlos)

Corresponding author

Eder João de Arruda

ftederarruda@gmail.com

+55 19 9 9761 5276

UFSCar - Rodovia Whashington Luis, Km 235, SP 310, Jardim Guanabara, São Carlos – São Paulo, 13.565-905 – Brazil.

ABSTRACT

The pelvic waist is a structure that holds great importance for locomotion. Interventions requiring pelvic immobilization deserve attention by the resulting functional loss. Thus, the study aimed to present a pelvic immobilization device for rats and evaluate the chemo-metabolic alterations on the pelvic musculature in question. Eighteen rats were divided into three groups (n = 6): control (C), pelvic immobilization for 7 days (IP) and remobilized for 7 days after 7 days of device use (RP7). Then analysis chemo-metabolic in pelvic muscles involved were done. The data were processed with the

Kolmogorov-Smirnov test followed by ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$ for all tests). The glycogen reserves reduced on average 68% in the IP group and 50% in the RP7 group. The glucose decay constant (KITT) had a delay of 10% in the IP group. The ratio of total protein / DNA showed that there was a reduction of 28 and 24% in the gluteo maximus and 32 and 16% in the iliopsoas from the IP and RP7 groups, respectively. It found an increase of cytokines (IL-6 and 10) in the IP and RP7 groups, and only the IP group showed an increased of TNF- α . So the model was effective in inducing the disuse of the muscles in question.

Key words: cytokines, disuse, glycogen, immobilization, immobilization device, interleukin, metabolism, muscles, non-invasive model, pelvis, pelvic muscles, rats.

INTRODUCTION

The pelvis presents itself as an osteomyoarticular structure holding great importance for locomotion, organ sustainment, thermoregulation and other functions related to the central nervous system.^[1]

Emphasizing locomotion, the pelvis is a fundamental structure connecting the spine and lower limbs, and for motor performance of these structures it is necessary balance, supporting and coordination, in a way that any functional alteration on the pelvis might result in systemic functional loss.^[2,3]

Recent data point out that pelvic ring injuries are strongly related to a high morbidity rate, resulting in short term complications and this might implicate significant costs for the functional recovery process. It is also stated that the occurrence of pelvic injury on big urban centers happens on a rate of about 23 for each 100,000 inhabitants and total mortality ranges from 4 to 23% between places.^[4,5]

Since it is an anatomic structure that contribute for the mobility of the trunk and lower limbs, pelvic ring injuries commonly require immobilization, which is often employed from the acute to the outpatient stages of the treatment.^[6] This way, immobilization as a therapeutic resource may trigger atrophy due to muscular disuse, which derives from a complex interaction of mechanisms that culminate with muscular catabolism.^[7,8]

Regarding immobilization devices for studying muscular disuse, literature presents invasive and non-invasive models, which in its majority are developed for studying joint immobilization of the hind limb in rats^[9-12] and invasive and non-invasive models of scoliosis induction and trunk restraint.^[13-15]

Due to the absence in literature of an experimental model for immobilization and the significant issue resulting from the involvement to that structure, the present study aims to develop a model for pelvic immobilization for rats and evaluate the chemo-metabolic alterations on the pelvic musculature in question.

METHODS

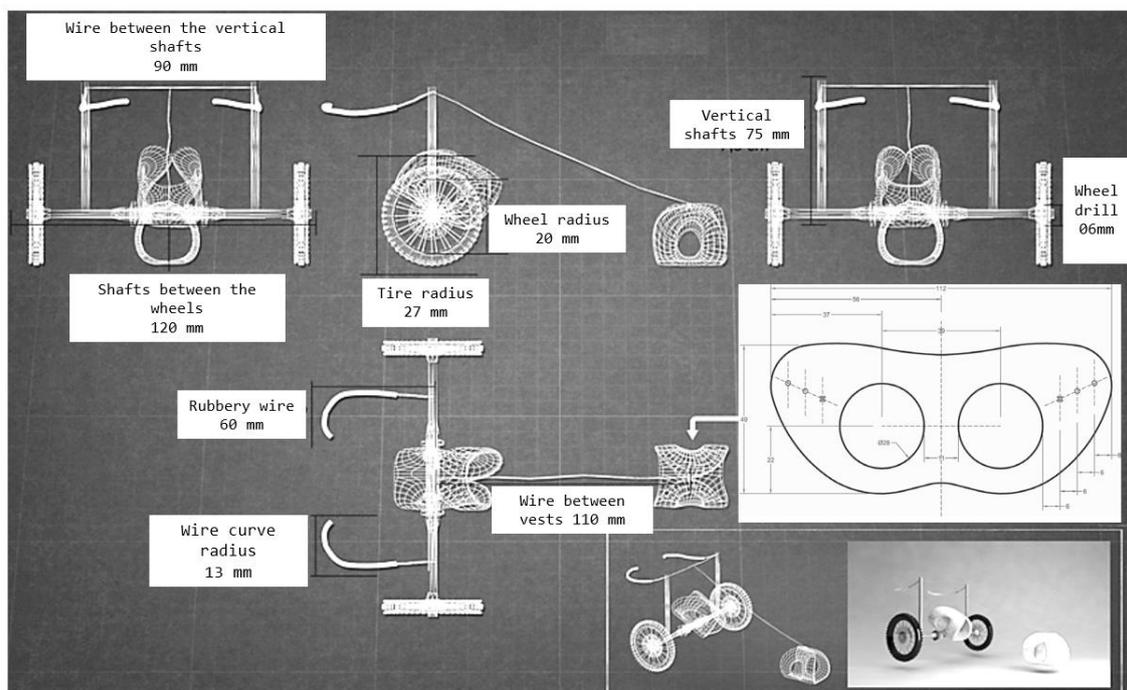
The present study got approval from the Ethics Committee for Animal Experimentation from the Methodist University of Piracicaba (UNIMEP) under the protocol no. 05/2014. The ethical principles established on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals were also strictly followed.^[16]

18 Wistar, male rats (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), 3 months old and weighting 250±20g were employed for this experimental procedure. The animals were sorted in three

groups (n=6), of which: control (C), pelvic immobilization for 7 days (PI) and the re-mobilized group (RP7), that spent 7 days without the device, after the 7 days of immobilization. In order to increase the influence of the sample, it was opted for collecting bilateral muscular samples (n=12) from the studied groups.

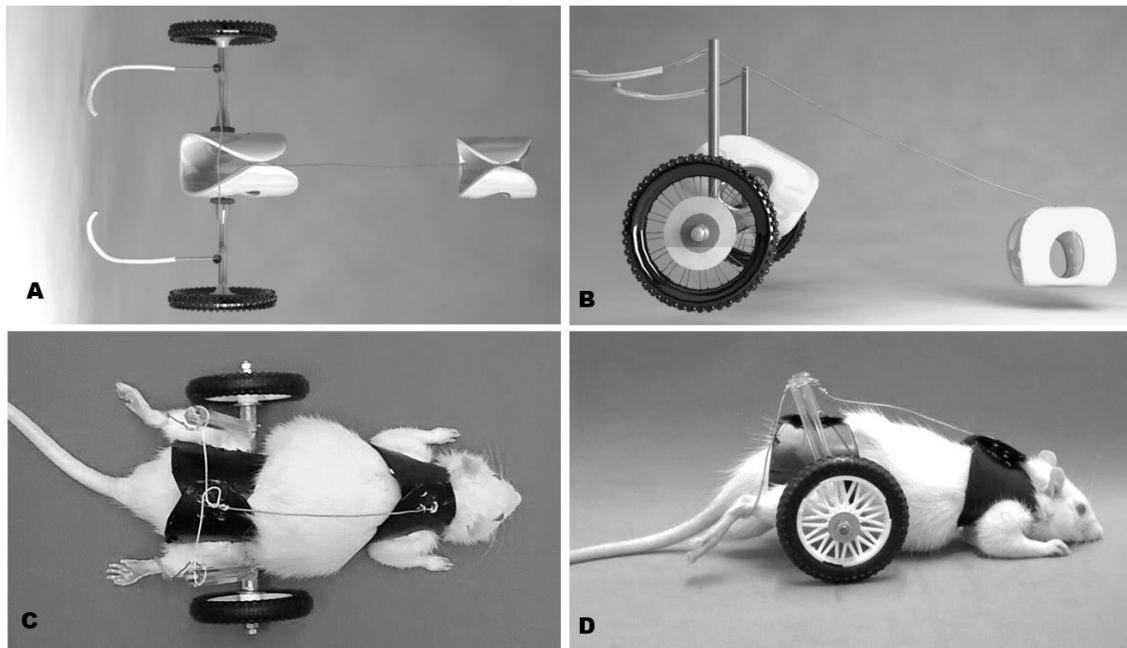
Immobilization Model

To develop the pelvic immobilization model, the current study was based on the work of Silva et al.^[14], which presents a device composed of Polyvinyl Chloride (PVC) vests, appropriate for the induction of scoliosis in rats. In the present study, scapular and pelvic scoliosis induction vests were employed, followed by the suspension structure, which was developed using acrylic tubes, plastic wheels, thin wire, bolts and nuts. In the picture 1 it is presented the schematic representation of the model, designed in the Blueprint[®] software.



Picture 1.

The proposed model for pelvic immobilization consists in a system for suspending the (pelvic) posterior waist and hind paws (picture 2, A and C), in a way that the wheels (picture 2, B) favor mobility, while restricting the action of the involved musculature (picture 2D).



Picture 2.

Evaluations

Evaluation of the muscular glycogen reserves (metabolic rate)

Samples from the following muscles were collected: rectus femoris (RF), adductor brevis (ADB), adductor longus (ADL), lower abdominal (LAB), upper abdominal (UAB), gluteus medius (GM Med), gluteus maximus (GM Max), Iliopsoas (ILP), and a cluster of the paravertebral muscles (PV) in the pelvic region. The acid hydrolysis in the presence of phenol method was employed.^[17] The values are expressed in mg/100 mg of wet weight.

Concentration of Total Proteins and DNA (myonuclei rate):

Samples of the gluteus maximus and iliopsoas muscles were submitted to evaluation of the concentration of total proteins, through the PROTAL kit from Laborlab® and the samples of the DNA through the method proposed by Giles and Myers.^[18]

Insulin Tolerance Test (ITT)

In order to conduct the ITT, on the 6th day the rats were anesthetized and after 10 minutes it was performed a cut on the animal tail where an aliquot of blood was collected and the glycaemia was assessed by a stripe used in glycogen testing, obtaining then the time zero. Followed up by the administration of insulin (2 U/Kg/ip - Biohulin), blood samples were collected in the 2.5 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min and 30 min timeframes, so the glycaemia could be assessed again to determine the Glucose Decay Constant (KITT). The group RP7 was evaluated 6 days after the removal of the immobilization model.

Serum level of Interleukin 6, 10 and TNF- α

The ELISA method was employed and the specifications corresponding to the Kit (BioSource International) were followed (NISHIYAMA et al., 2000).

After anesthesia of sodium pentobarbital (40 mg/Kg), the blood samples were collected through the renal vein, and then put on ice. The serum was isolated, packaged in an Eppendorf tube and then allocated in a freezer under -70°. The values are expressed in pg/mL.

Statistical Analysis

The data were submitted to an ANOVA Kolmogorov-Smirnov normality test and a Tukey test. In every calculation a critical level of $p < 0.05$ was set.

Euthanasia

The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/Kg) and then submitted to the cervical dislocation technique. The group RP7 underwent euthanasia 7 days after the removal of the immobilization model.

RESULTS

Evaluation of the glycogen reserves

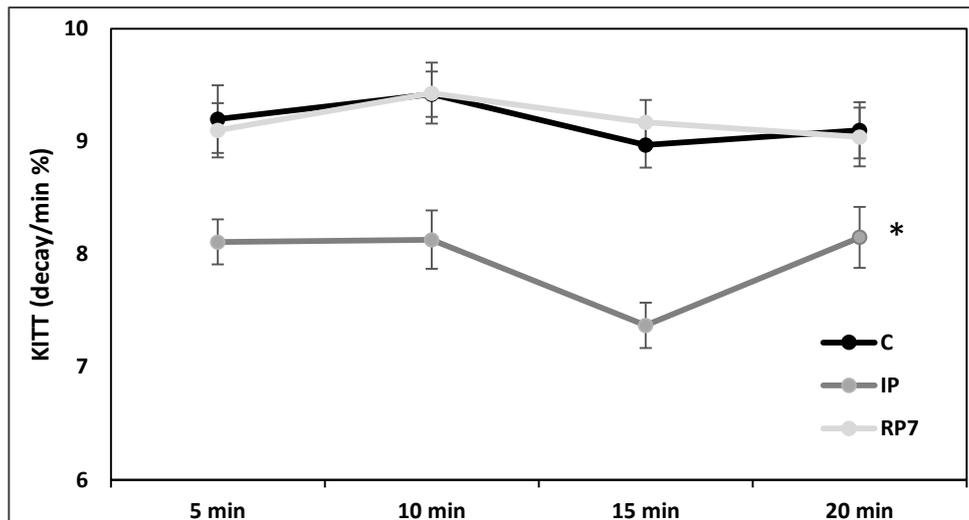
It was observed that the musculature of the group that underwent the pelvic immobilization (PI) got severely compromised in comparison to the control group, in a way that the glycogen reserves reached critical reduction levels, as showed on table 1, that presents the percentage of reduction, as well as the values (table 2) of the glycogen concentration that express statistical difference ($p < 0.05$).

Even though the group RP7 resumed walking for 7 days, it was observed that the glycogen reserves were not reestablished in comparison with the group C. On the other hand, when comparing with the group PI, there was an increase of the muscular glycogen reserves ($p < 0.05^{\#}$) as pointed out in the tables 1 and 2.

Table 1.

Table 2.

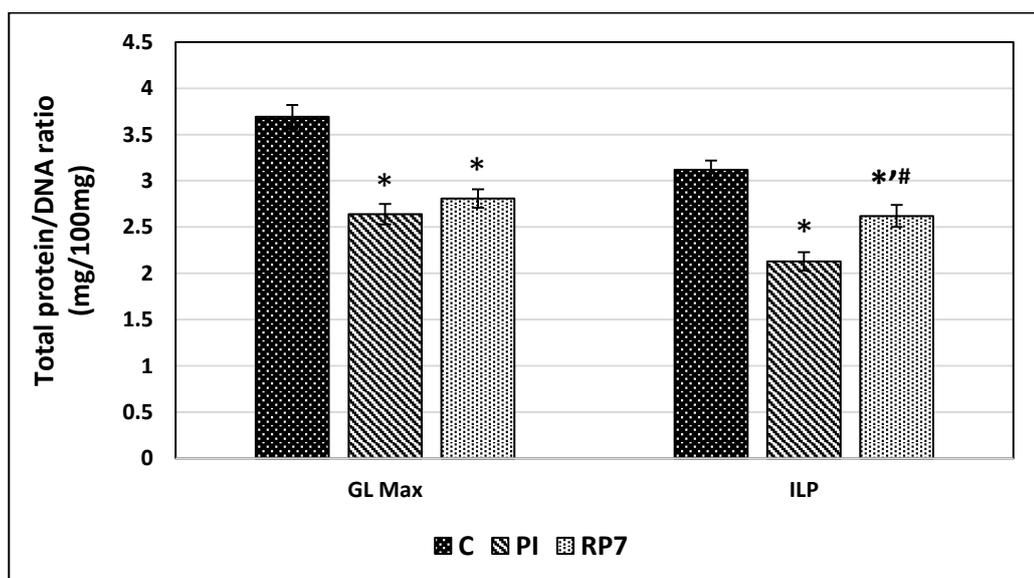
The set of data regarding insulin sensitivity revealed that there were no significant alterations between group C (9.10 ± 0.02) and group RP7 (9.13 ± 0.02). On the other hand, the group PI presented a delay of 10% (8.24 ± 0.03) in the decay constant in comparison to the group C (picture 3). That evaluation points out that the disuse due to orthosis may interfere in tissue sensitivity.



Picture 3.

Evaluation of the total protein/DNA ratio

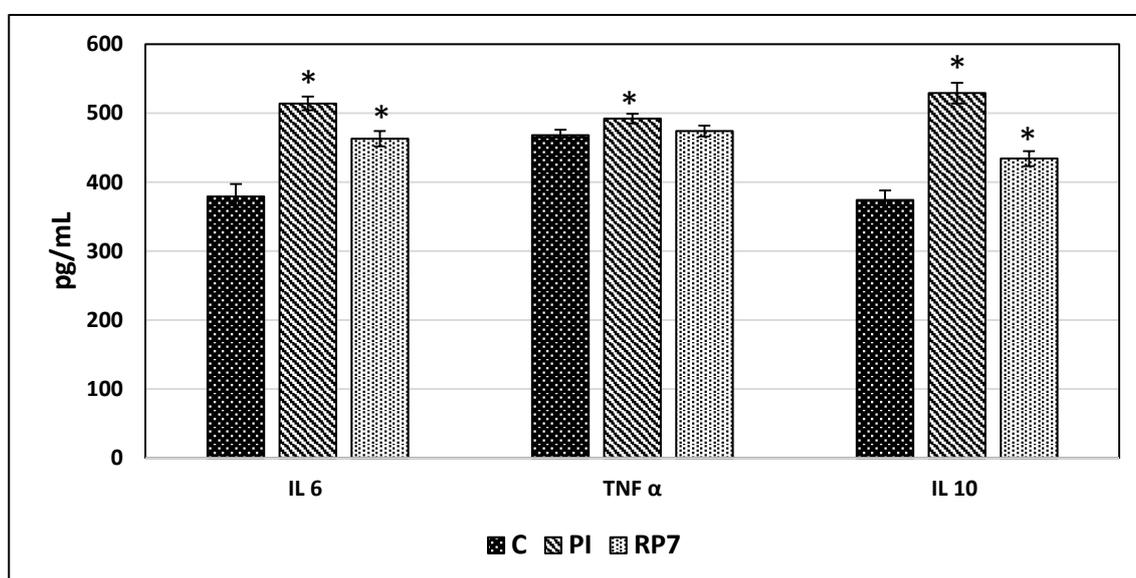
The total protein/DNA ratio of the gluteus maximus (GL Max) and Iliopsoas (ILP) muscles emphasized that the groups PI and RP7 presented reduction ($p < 0.05^*$) of 28 and 24% in GL Max and 32 and 16% in ILP, respectively, when compared to group C. On the other hand, group RP7, in comparison to group PI, demonstrated less compromise of the total protein/DNA ratio, highlighted by an increase of 19% ($p < 0.05^*$) in the ILP muscle, as depicted in picture 4.



Picture 4.

Evaluation of the Cytokines

In the evaluation of the serum level of interleukin 6, there was an increase of 27.3% on group PI and 19.2% on group RP7, when compared to group C. It was identified that interleukin 10 demonstrated an increase of 30.4% and 14.9% on groups PI and RP7, respectively. Finally, the tumor necrosis factor (TNF- α) presented a slight increase of 5% on group PI compared to group C, while group RP7 did not show any difference in comparison to group C (picture 5).



Picture 5.

DISCUSSION

The pelvic waist is a structure that holds great importance for locomotion, in a way that it can often be affected by conditions that demand therapeutic immobilization, which in an iatrogenic way results in disuse syndrome.

Studies point out that after 48 hours of disuse the muscular tissue suffer modifications of great magnitude, such as; alterations on the insulin signaling mechanisms, increase of inflammatory cytokines, decrease of the glycogenic reserves, as well as decrease of the protein content, besides alterations of histological and molecular

aspects.^[8,19] The effects of immobilization may show up right after a few hours, yet literature presents a consensus regarding immobilization time of 7 days.^[9,10]

In the current study it was noted that both glycogenic reserves and decay constant (KITT) were compromised on the animals that had their pelvis immobilized, revealing compromise in glycogenesis, which can be resulting from insulin resistance. Although the animals that were re-mobilized after 7 days (RP7) did not recover their glycogenic reserves, it was observed that KITT was similar to the one from the control group, suggesting activation of the anabolic ways and catabolic inhibition.

These findings are supported by the mechanisms of regulation of the glycogen synthesis, once the insulin as an anabolic hormone stimulate the accumulation of glycogen through the increase of transportation of glucose in the muscle, while favoring the glycogen synthesis on the liver and on muscular tissue, process which happens through dephosphorylation of the glycogen synthase enzyme.^[20]

The comprehension of the systemic repercussion can be based on the fact that right after the stimulus with insulin, the Akt phosphorylated and inactivated to GSK-3, which reduces the phosphorylation rate of the glycogen synthase, increasing its activity. It is also highlighted that the insulin also activates protein phosphatase 1, through a mechanism depending on PI 3-kinase, which directly dephosphorylates the glycogen synthase.^[21]

The total protein/DNA ratio of the muscles GL Max and ILP was drastically reduced. As such, it is known that the control of the synthesis of proteins begins with the formation of ribonucleic acid (RNA) in the nucleus, under the control of the deoxyribonucleic acid (DNA). Thus, a reduction of the contractile activity interferes in fundamental mechanisms for gathering amino acids in muscular tissue, once the amino acid transportation rate is proportional to the contractile activity, regardless of insulin

action.^[8,22,23] Anatomical and biomechanical factors may have influenced so the ILP muscle presented an increased compromise.

To evaluate the immune response by applying the pelvic immobilization model, it was opted for analyzing the IL-6, 10 and TNF- α cytokines. During this analysis, it was observed that the proposed immobilization model activated pro-inflammatory (TNF- α and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10 and IL1ra) mechanisms, with higher significance on group PI. It is also highlighted that the concentration increase of these cytokines aim to activate anabolic ways and minimize the activity of catabolic mechanisms in physical activity or disuse conditions.^[24,25]

In the current study the IL-10, which is an anti-inflammatory cytokine demonstrated to be more elevated than the IL-6, which is pro-inflammatory. This indicates the pelvic immobilization triggered an increasingly intense inflammatory response, once that, when the muscular glycogen content is reduced there is the activation of the transcription for the IL-6 gene.^[24] It is worth pointing out that the expression of IL-10 was lower on group RP7 while the concentration of TNF- α did not suffer alteration on the same group. It is also important to bear in mind that the IL-10 is the main modulator anti-inflammatory cytokine in the production of TNF- α .^[26]

Even though the group PI presented a slight increase of TNF- α , it is worth noting the production of TNF- α is not exclusively carried out by monocytes and macrophages, considering the gene and protein expression of TNF- α in skeletal muscle was characterized in human beings, in a study that demonstrated, for the first time, the presence of such cytokine in the absence of infiltrating monocytes or macrophages.^[27] Such fact emphasizes that the muscular tissue can produce it by itself, acting so in autocrine and paracrine ways, in the exact amount to modulate a series of morphological and functional alterations on the tissue.^[28]

It is noteworthy that the physiological alterations presented here are similar to the ones observed in another muscular disuse experimental models^[9,10,15] which grants to this model a double utility since it favors the study of both physiological systems under simulated weightlessness and reduced muscular activity conditions.

CONCLUSION

The proposed pelvic immobilization model in experimental condition has proven to be effective in mimicking muscular disuse, and such fact is emphasized by the reduction of the energetic reserve on pelvic muscles, followed up also by the reduction of the total protein/DNA ratio. The proposed model also triggered a mechanism of attempt to reverse protein catabolism, highlighted by the increase of the serum level of interleukin 6 and 10. Finally, the methodological practicality and the low cost of the model deserve to be highlighted when fostering future studies that may look for early strategies of physiotherapeutic intervention in cases of pelvic immobilization.

Pictures legends

Picture 1: Graphical representation of the model applied to pelvic immobilization in 3 months rats. The measures are expressed in millimeters (mm).

Picture 2: Pelvic immobilization device in top view - project (A) and fitted to the animal (C). Suspension system project in side view (B) and on the same plane (D) it's possible to observe the device fitted in the animal.

Picture 3: Glucose decay constant (KITT; % min) of the groups: control (C), pelvic immobilization (IP), remobilized after 7 days (RP7). Values are expressed in average \pm sem, n = 6, p <0.05 * compared to C.

Picture 4: Total protein/DNA ratio (mg/100mg) of the muscles gluteus maximus (GL Max) and iliopsoas (ILP) of the control group (C), pelvic immobilization (IP) and remobilized after 7 days (RP7). Values are expressed in average \pm sem, n = 6, where * p <0.05 compared to control and #p <0.05 compared to the IP.

Picture 5: Serum level of interleukin 6 (IL6), interleukin 10 (IL10) and tumor necrosis factor (TNF- α) of the groups: control (C), pelvic immobilization (IP) remobilized after 7 days (RP7). Values are expressed in pg/ml and correspond to the average \pm sem, n = 6 p <0.05 * compared to C.

Tables

Table 1. Reduce percentage of energy reserves (glycogen) in the muscles involved in pelvic immobilization process of the groups IP and RP7 compared to Control ($p < 0.05$ *) and increase percentage in the comparison between RP7 and IP ($p < 0, # 05$).

Muscles	↓ % Glycogen IP/C*	↓ % Glycogen RP7/C*	↑ % Glycogen RP7/IP#
Gluteus maximus	76 %	55 %	21 %
Gluteus médio	69 %	47 %	22 %
Paravertebral	64 %	43 %	21 %
Adductor brevis	57 %	53 %	4 %
Adductor longus	67 %	53 %	14 %
Rectus femoris	70 %	48 %	22 %
Iliopsoas	75 %	60 %	15 %
Upper Abdominal	66 %	40 %	26 %
Lower Abdominal	75 %	55 %	20 %

Table 2. Glycogen concentration (mg/100mg) of the groups: control (C), pelvic immobilization (IP) and remobilized after 7 days (RP7). Values are expressed in average \pm sem, $n=12$, $p < 0.05$ * compared to control and $p < 0.05$ # compared to IP.

Muscles	C	IP	RP7
Gluteus maximus	0,85±0,03	0,20±0,08*	0,38±0,03*.#
Gluteus médio	0,87±0,04	0,26±0,03*	0,46±0,05*.#
Paravertebral	0,81±0,05	0,29±0,03*	0,46±0,05*.#
Adductor brevis	0,75±0,03	0,32±0,05*	0,35±0,03*.#
Adductor longus	0,94±0,01	0,31±0,03*	0,44±0,02*.#
Rectus femoris	0,85±0,03	0,23±0,04*	0,41±0,03*.#
Iliopsoas	0,98±0,01	0,24±0,03*	0,40±0,04*.#
Upper Abdominal	0,88±0,03	0,30±0,07*	0,52±0,02*.#
Lower Abdominal	1,02±0,06	0,25±0,03*	0,46±0,01*.#

Bibliography

1. Kurki H. Skeletal variability in the pelvis and limb skeleton of humans: does stabilizing selection limit female pelvic variation? *Am J Hum Biol.* 2013. 25:795–802.
2. Gruss LT, Schmitt D. The evolution of the human pelvis: changing adaptations to bipedalism, obstetrics and thermoregulation. *Biol Sci.* 2015 Mar; 370(1663).
3. Haws BE, Wuertzer S, Raffield L, Lenchik L, Miller AN. Criteria for level 1 and level 2 trauma codes: Are pelvic ring injuries undertriaged? *World J Orthop.* 2016 Aug; 7(8):481-6.
4. Dunet B, Tournier C, Billaud A, Lavoine N, Fabre T, Durandea A. Acetabular fracture: long-term follow-up and factors associated with secondary implantation of total hip arthroplasty. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2013; 99:281-290.
5. Dodd AC, Bulka C, Jahangir A, Mir HR, Obrebsky WT, Sethi MK. Predictors of 30-day mortality following hip/pelvis fractures. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2016 Aug; 2.
6. Lee C, Porter K. The prehospital management of pelvic fractures. *Emerg*

- Med J. 2007 Feb; 24(2):130-3.
7. Petrini AC, Ramos DM, Gomes de Oliveira L, Alberto da Silva C, Pertille A. Prior swimming exercise favors muscle recovery in adult female rats after joint immobilization. *J Phys Ther Sci.* 2016 Jul; 28(7):2072-7.
 8. Rudrappa SS, Wilkinson DJ, Greenhaff PL, Smith K, Idris I, Atherton PJ. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. *Front Physiol.* 2016 Aug; 7:361.
 9. Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensão A, Magalhães J, Duarte J, Amado F. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. *Rev Port Cienc Desp.* 2004; 4(3):94–111.
 10. Durigan JLQ, Cancelliero KM, Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ. Modelos de desuso muscular e estimulação elétrica neuromuscular: aspectos pertinentes à reabilitação fisioterapêutica . *Fisioter Mov.* 2005 dez; 18(4).
 11. Yoshida S, Matsuzaki T, Kamijo. Histopathological Changes in the Periphery of the Sciatic Nerve of Rats after Knee Joint Immobilization. *J Phys Ther Sci.* 2013 May; 25(5):623–626.
 12. Yoshida S, Matsuzaki T, Hosono M. An immunohistochemical study of the sciatic nerve in a rat knee immobilization model. *J Phys Ther Sci.* 2016 Apr;28(4):1116-9.
 13. Stokes IA, McBride CA, Aronsson DD. Intervertebral disc changes in an animal model representing altered mechanics in scoliosis. *Stud Health Technol Inform.* 2008;140:273-7.
 14. Silva CA, Guirro RR, Delfino GB, Arruda EJ. Proposal of non-invasive experimental model to induce scoliosis in rats. *Rev Bras Fisioter.* 2012 Jun;16(3):254-60.
 15. Guirro RRJ, Arruda EJ, Silva CA. Disuse induced by the spine rectification vest: experimental study. *Fisioter Pesqui.* 2014; 21:21-26.
 16. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition, National Academies Press (US); 2011.
 17. Siu LO, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J App Physiol.* 1970; 28(2), 234-6.

18. Giler KW, Myers A. An improved diphenylamine method for the stimulation of deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1965; 206:93-99.
19. Kodama FY, Camargo RC, Job AE, et al. Muscle mechanical properties of adult and older rats submitted to exercise after immobilization. *Acta Ortop Bras*. 2012; 20:218–222.
20. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46(4):419-425.
21. 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.
22. Kimbal SR, Vary TC, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by insulin. *Rev. Physiol*. 1994. 56:321-48.
23. Liu X, Trakooljul N, Hadlich F, Muráni E, Wimmers K, Ponsuksili S. MicroRNA-mRNA regulatory networking fine-tunes the porcine muscle fiber type, muscular mitochondrial respiratory and metabolic enzyme activities. *BMC Genomics*. 2016 Aug;17:531.
24. Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, Neufer PD. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J*. 2001; 15:2748-50.
25. Tyrone AW, James PW, Davis JM, Wilson LB, Lowe LL, Sato S, Carson JA. Skeletal Muscle Mass Recovery from Atrophy in IL-6 Knockout Mice. *Acta Physiol*. 2011 Aug; 202(4):657–669.
26. Lopes RD, Junior MLB, Rosa JC, Lira FS, Martins Jr E, Shimura AY, et al. Alterações na Produção de IL-10 e TNF- α no Músculo Esquelético em Ratos com Insuficiência Cardíaca Secundária ao Infarto do Miocárdio. *Arq Bras Cardiol*. 2010 Mar; 94(3):313-320.
27. Saghizadeh M, Ong J, Garvey W, Henry R, Kern P. The expression of TNF alpha by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996; 97(4):1111-6.
28. Spate U, Schulze PC. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004; 7:265-9.

Acknowledgments

All authors contributed sufficiently to the practical and intellectual content of the manuscript, with the collection and analysis of data, as well as its writing. All agree to have the name listed as contributors and are aware of the statement responsibility of authorship. All authors have full knowledge of the journal's publication police, so that this study was carefully reviewed and approved by all the named authors. There is no conflict of interest. This manuscript costs were fomented by CNPq - National Counsel of Technological and Scientific Development.

Estudo – III

Influence of low level laser therapy (830nm) on muscle metabolism and cytokine concentration during and after pelvic immobilization: study in rats.

Submetido: "*Experimental Physiology*", em 20 de Janeiro de 2017, sob a referência nº - EP-RP-2017-086282.

Influence of low level laser therapy (830nm) on muscle metabolism and cytokine concentration during and after pelvic immobilization: study in rats.

Eder João de Arruda¹, Carlos Alberto da Silva², Rafaela Ferreira³, Nivaldo Antonio Parizotto⁴.

1 – PhD Student in Physiotherapy – UFSCar (Federal University of São Carlos)

2 – Professor of the Post-graduation Program in Physiotherapy – UNIMEP (Methodist University of Piracicaba)

3 – Master degree in Physiotherapy – Unimep (Methodist University of Piracicaba)

4 – Professor of the Post-graduation Program in Physiotherapy – UFSCar (Federal University of São Carlos)

Corresponding author

Eder João de Arruda

ftederarruda@gmail.com

+55 19 9 9761 5276

UFSCar - Rodovia Whashington Luis, Km 235, SP 310, Jardim Guanabara, São Carlos – São Paulo, 13.565-905 – Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Photobiomodulation can activate anti-catabolic mechanisms in muscle tissue in disuse. **Objective:** To evaluate the chemo-metabolic effects photobiomodulation during and after pelvic immobilization in rats. **Methodology:** 30 rats were distributed in five groups (n = 6): Control (C), Pelvic Immobilization (PI), Immobilized 7 days and remobilized for 7 days (IR), Laser during pelvic

immobilization (LDPI) and Laser after pelvic immobilization (LAPI). The photobiomodulation (Ga-Al-As, $\lambda = 830$ nm, P = 30 mW, beam area = 0.116cm², T = 14 s, Fluency of 7J/cm², E = 0.42J, Power density of 0.25 W/cm²) applied in 8 points for 7 consecutive days. Muscle glycogen, total protein/DNA ratio, plasma concentration of TNF- α , interleukin 6 and 10 were analyzed. The data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test followed by ANOVA and Tukey's test (with a critical level of $p < 0.05$). **Results:** Glycogen reserves reduced in all groups, with higher severity in the PI group and lower in the LDPI and LAPI groups. The total protein/DNA ratio of the muscles short adductor and gluteus maximus decreased in all groups, however LDPI showed better results. IL-6 and IL-10 cytokines were elevated considerably in the IP group and elevated with a lesser extent in the LDPI and LAIP groups. TNF- α raised in the PI and IR groups, but there was no significant changes in LDPI and LAPI groups. **Conclusion:** Before pelvic immobilization in the experimental condition, the photobiomodulation minimized catabolism mechanisms and presented a better chemo-metabolic response when applied during the immobilization period.

Key words: Laser, infrared, pelvic immobilization, muscles, rats.

Introduction

The skeletal muscle tissue is capable of great morphological and functional adaptation, responding to different ways of stimulation or different ways of deprivation of stimulation, as in the cases of atrophy induced by disuse (Mukay et al, 2016; Powers et al., 2016).

With regards to situations of stimuli deprivation, both in rats and humans, it is possible to note reduction of energy reserves (Guirro et al., 2014), reduction of the myonuclei number and activation of satellite cells (Li et al., 2016), insulin resistance followed by decrease of protein synthesis (Rudrappa et al., 2016), mitochondrial damage (Mukay et al., 2016), proliferation of collagen fibers, decrease of effectiveness in neuromuscular joints, triggering of inflammatory

processes and inhibition of growth factors (Frara et al., 2016), alteration on the formation of the actomyosin complex, decreased availability of Ca^{2+} , and alteration of the kind of muscular fiber (Lamboley et al., 2016), as well as other findings, considered compatible with the muscular atrophy condition.

Recent studies presented different ways to the study of disuse muscle atrophy, in a way that the employed models are discriminated as invasive and non-invasive models, which differ from each other by the variants of complexity in their implementation, with focus on the hindlimbs of rats (Yoshida, Marsuzaki, Hosono, 2016; Chowdhury et al., 2016). It is also worth mentioning the existence of invasive and non-invasive models of scoliosis and trunk restraint induction (Stokes, McBride and Aronsson, 2008; Silva et al., 2012; Guirro, Silva and Arruda, 2014). However, an immobilization model for the study of pelvic muscle atrophy is not found in the literature.

Disuse conditions may result in a disability condition, which in some cases may cause irreversible damage, and such fact demand strategies of early intervention. That point of attention has been made so that physiotherapy, as well as other areas, engages in efforts to the development of methodologies and improvement of resources that may be applied the earliest way possible in favor of functional recovery (Silva et al., 2012).

This way, the photobiomodulation (PBM) is considered a safe and effective strategy of therapeutic intervention, when applied to the muscular tissue, as the PBM favors the reduction of inflammatory infiltrate, reduction of lipid peroxidation, the creatine kinase concentration, the expression of proinflammatory cytokines, it also stimulates the formation of myotubes, promotes angiogenesis, increases the number of regenerating fibers, as well as mitochondrial activity, besides improving the organization of regenerated muscular fibers, increasing the availability of cellular energy, and inducing the expression of cell cycle regulating proteins that activate satellite cells (Ferraresi et al., 2015; Fritsch et al., 2016).

Focusing on the muscular tissue in atrophy, Nakano et al (2012) applied the PBM by LLLT in rats (Ga-Al-As, 830 nm; 60mW, 0.6J/cm², total, 180 s) and observed increase in satellite cells and angiogenesis. In dystrophic muscular cells, it was possible to verify that the PBM by LLLT (Ga-Al-As, 830 nm, 30 mW, 5J/cm²) proved efficient in cell proliferation, reduction of oxidative stress and reduction of the inflammatory process (Macedo et al., 2015).

A recent systematic review pointed out that in experimental aspects for locomotive affections the most employed wavelengths are 904 nm and 830 nm, in a way that the doses vary from 0.12J to 50J. Thus, the reduction of the inflammatory response is the most common finding through PBM in acute orthopedic injuries (Souza, Silva, 2016).

When considered the catabolic condition that the muscular tissue may present due to disuse, the PBM presents itself as an important intervention strategy. This way, the current study aims to evaluate the chemo-metabolic responses of glycogenic reserves, total protein/DNA ratio, and inflammatory cytokines through the use of PBM by LLLT during and after the period of pelvic immobilization in rats.

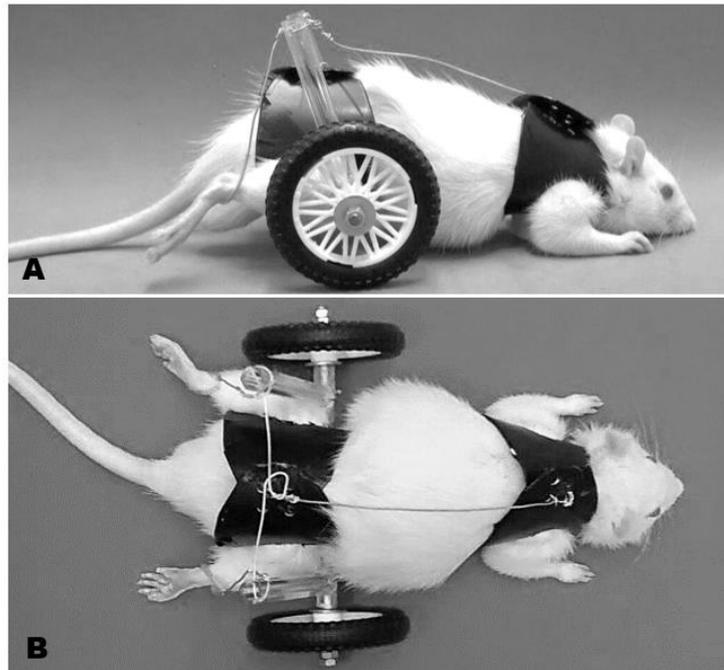
Methodology

The present study got approval from the Ethics Committee for Animal Experimentation from the Methodist University of Piracicaba (UNIMEP) under the protocol no. 05/2014. The ethical principles established on the eighth edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011) were strictly followed.

30 Wistar (*Rattus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), male rats, 3 months old and weighting 250 ± 20 g were used in this study. The animals were randomly divided in five groups (n=6), where: Control (C), Pelvic immobilization (PI), Immobilization for 7 days and remobilized for another 7 (IR), Laser during the 7 days of pelvic immobilization (LDPI), and Laser for 7 days after the immobilization period (LAPI). In order to increase the influence of the sample, it was opted for collecting bilateral muscular samples (n=12) from the studied groups.

Pelvic Immobilization Model

The model stem from the study of Silva et al, (2012), that proposed an immobilization way with the objective of generating scoliosis. What differs from that, in the current study, is that besides not developing spinal inclination, the employed model has a suspension system with wheels and shafts, in a way that the pelvis and hindlimbs remain suspended, as demonstrated in picture 1.



Picture 1: Pelvic Immobilization Model in side view (A) and top view (B).

Photobiomodulation Protocol

Characteristics of the equipment and parameters employed

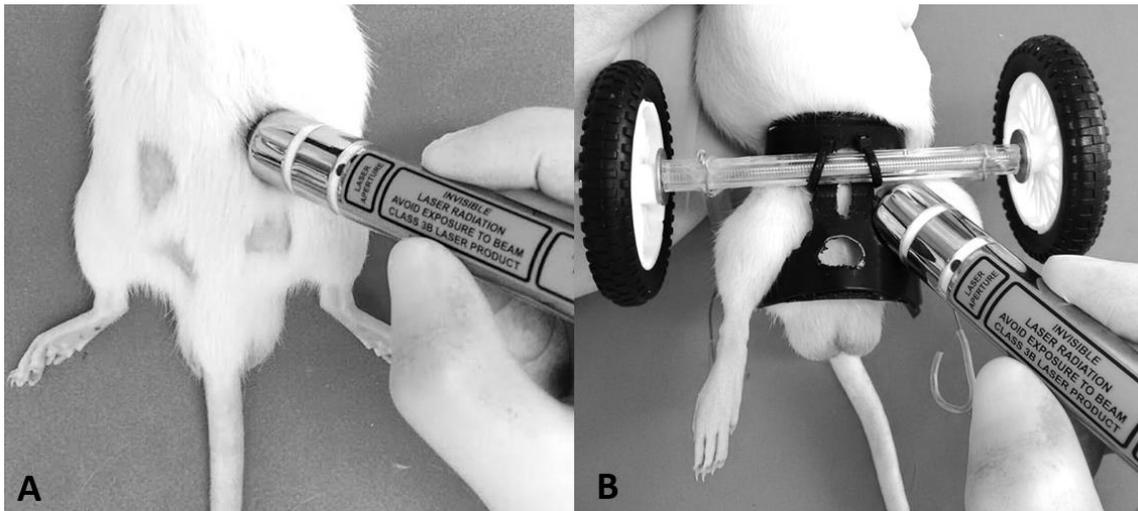
It was utilized the Laserpulse Ibramed[®] equipment, Gallium Aluminum Arsenide (Ga-Al-As) semiconductor diode. The equipment went through calibration (Masterfield, Filter Coherent, Santa Clara, CA) before and after the experimental procedures, by the Center for Research in Optics and Photonics (CPOF) of the São Carlos Institute of Physics, in order to grant extreme reliability to the laser.

Based on the literature that presents results *in vivo* and *in vitro* (Macedo et al., 2015; Souza and Silva, 2016), it was employed the wavelength of 830 nm (infrared), optical power output of 30 mW, beam cross sectional area of 0.116cm², irradiation time of 14 seconds (s) per point (8 points), flow of 7J/cm², energy per pulse of 0.42J, power density of 0.25 mW/cm², and emission in continuous mode.

Application of the technique

The PBM treatment protocol was based on the application of LLLT during 7 consecutive days, through point-by-point technique, with beam incidence angle maintained perpendicular (90 degrees) to the irradiation surface. 4 points of application in the dorsal region (picture 2, A) and 4 in the ventral region were

established. Without the need of anesthesia or sedation, two researchers took part in this procedure, where the first released the back part of the vest and used a cotton tissue to ensure the containment of head and trunk of the animal, while the second researcher was responsible for performing the PBM by LLLT. The group that was stimulated during the immobilization period (picture 2, B) had their device pierced in order to maintain the constraint. It is worth pointing out that the device employed in the pelvic immobilization was designed to not interfere in the defecation and urination activities of the animal.



Picture 2: Points of application of PBM by low-level laser therapy in the groups LAPI (A) and LDPI (B).

Sampling

After the experimental period, the animals suffered euthanasia by decapitation, and the blood collected and centrifuged for plasma separation, which was submitted to biochemical evaluation. Pelvic muscle samples were then collected in an environment with ice and submitted to glycogen and total protein/DNA evaluations.

Glycogen reserves

The gluteus maximus (GL Max) and gluteus medius (GL Med), paravertebral (Pv) adductor brevis (Add B), adductor longus (Add L), rectus femoris (RF), iliopsoas (iLp), upper abdominal (UA) and lower abdominal (LA) muscles underwent the method of acid hydrolysis in the presence of phenol (Siu,

Russeau and Taylor, 1970). The values are expressed in mg/100 mg of wet weight.

Number of myonuclei: Total Protein Concentration and DNA

The Laborlab® PROTAL kit was used to assess the total protein concentration. The method proposed by Giles and Mayers (1965) was employed for quantifying the DNA. Those analyses were developed with the gluteus maximus (dorsal region) and iliopsoas (ventral region).

Serum level of Interleukin 6, 10 and TNF- α

The ELISA method was employed and the specifications corresponding to the Kit (BioSource International) were followed (Nishiyama et al., 2000).

The blood samples were collected through the renal vein after decapitation, and then put on ice. The serum was isolated, packaged in an Eppendorf tube and then allocated in a freezer under -70°C . The values are expressed in pg/mL.

Statistical Analysis: The data were submitted to a Kolmogorov-Smirnov normality test followed by ANOVA, and a Tukey test. In every calculation a critical level of $p < 0.05$ was set.

Results

Glycogen reserves

It was verified during the analysis of the energetic metabolism of the musculature involved in the pelvic immobilization, that the PI group presents severe reduction reaching mean values of 70% when compared to group C. The lower abdominal muscle, which has an important impact on the pelvis, presented the highest compromise (table 1). Group IR presents mean values reduced in 52% when compared to group C, although it was clear that the resumption of locomotion (without the device) increased the glycogen reserves up to the mean values of 18% when compared to group PI. Upon remobilization, the adductor brevis muscle presented the lowest response, while the lower abdominal muscle presented the highest response regarding energy reserves.

Both groups subjected to laser therapy during (LDPI) and after (LAPI) the period of pelvic immobilization did not present substantial difference ($p > 0.05$)

between them. On the other hand, laser therapy (during and after immobilization) assured a lesser compromise in the glycogen reserves, where it presented mean decrease values of 42.5% when comparing to group C. In the comparison between LDPI and PI, it is possible to verify a mean increase of 28% ($p < 0.05$) in the glycogen reserves. When comparing LAPI and IR, only the lower abdominal, adductor brevis and longus muscles presented a slight increase of the glycogenic content. The mean and standard error of the mean values are presented in table 1.

Table 1: Muscle glycogen (mg/100mg) of gluteus maximus (GL Max) and gluteus medius (GL Med), paravertebral (Pv), adductor brevis (Add B), adductor longus (Add L), rectus femoris (RF), iliopsoas (iLp), upper abdominal (UA) and lower abdominal (LA) muscles of Control (C), Pelvic immobilization (PI), Immobilization for 7 days and remobilized for another 7 (IR), Laser during the 7 days of pelvic immobilization (LDPI), and Laser for 7 days after the immobilization period (LAPI) groups. The values correspond to mean \pm standard error of the mean $p < 0.05^*$ different from Control (C), $p < 0.05^{\#}$ different from PI and $p < 0.05^{\epsilon}$ different from IR.

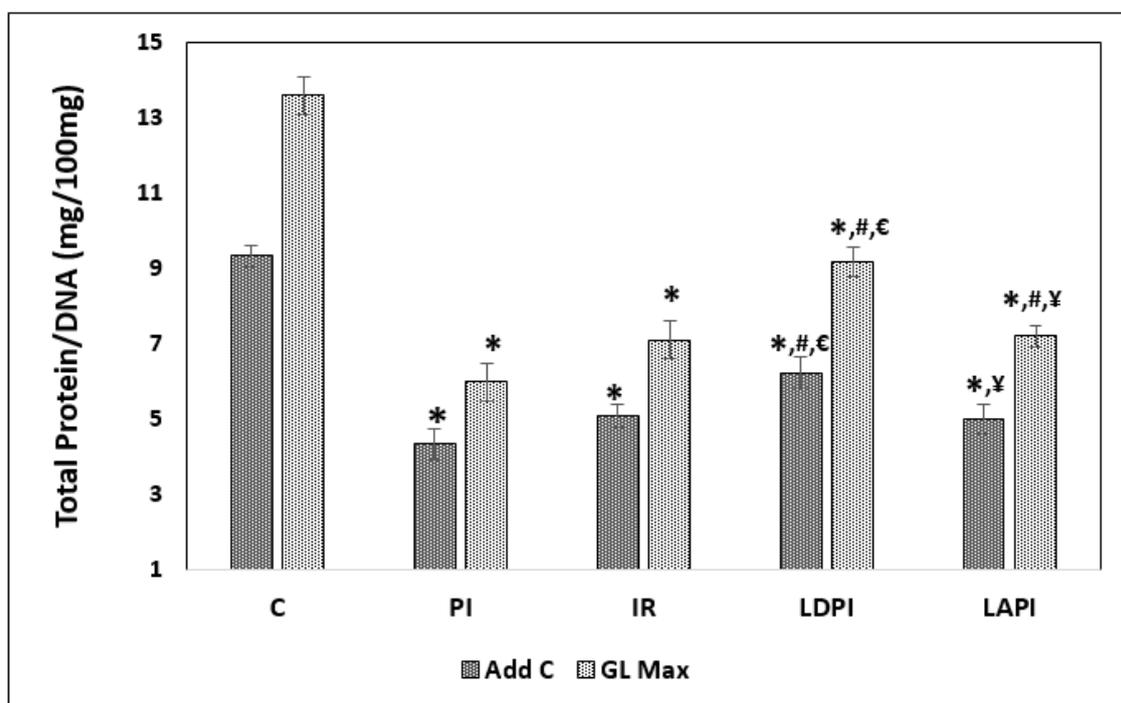
Muscle	C	PI*	IR* [#]	LDPI* [#]	LAPI* [#]
GL Max	0,85 \pm 0,03	0,20 \pm 0,08	0,38 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03	0,47 \pm 0,08
GL Med	0,87 \pm 0,04	0,26 \pm 0,03	0,46 \pm 0,05	0,51 \pm 0,04	0,55 \pm 0,01
Pv	0,81 \pm 0,05	0,29 \pm 0,03	0,46 \pm 0,05	0,52 \pm 0,03	0,53 \pm 0,02
Add B	0,75 \pm 0,03	0,32 \pm 0,05	0,35 \pm 0,03	0,41 \pm 0,04	0,48 \pm 0,04 [€]
Add L	0,94 \pm 0,01	0,31 \pm 0,03	0,44 \pm 0,02	0,51 \pm 0,03 [€]	0,54 \pm 0,06 [€]
RF	0,85 \pm 0,03	0,23 \pm 0,04	0,41 \pm 0,03	0,45 \pm 0,02	0,50 \pm 0,06
iLp	0,98 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03	0,40 \pm 0,04	0,44 \pm 0,03	0,49 \pm 0,08
UA	0,88 \pm 0,03	0,30 \pm 0,07	0,52 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	0,60 \pm 0,05
LA	1,02 \pm 0,06	0,25 \pm 0,03	0,46 \pm 0,01	0,53 \pm 0,04 [€]	0,55 \pm 0,03 [€]

When analyzing the results of the total protein/DNA ratio for the adductor brevis (Add B) and gluteus maximus (GL Max) muscles from the different groups, it was verified that the group PI presented a significant reduction of 55% in the Add C and 56% in the GL Max muscles, when compared to group C ($p < 0.05$). Group IR presented similar results to group PI ($p > 0.05$).

The muscle Add C in the group LDPI presented a 46% lower ratio than group C, although when compared to groups PI and IR, presented 44% and 17% higher TP/DNA ratio, respectively ($p < 0.05$). The analysis of the muscle GL Max for the same group (LDPI) showed a decrease of 48% in comparison to group C, which in comparison to groups PI and IR, presented a higher TP/DNA ratio of 52% and 29%, respectively.

Group LAPI presented lower TP/DNA ratios of 48% (Add C) and 47% (GL Max) when compared to group C ($p < 0.05$). The same LAPI group did not present different values for the muscle Add C when compared to PI and IR ($p > 0.05$) and

also presented a 20% lower TP/DNA ratio compared to group LDPI. The TP/DNA ratio of the muscle GL Max in group LAPI did not differ from group IR, and presented a 22% lower ratio in comparison to group LDPI (picture 3).



Picture 3: Total protein/DNA ratio of the muscles adductor brevis (Add C) and gluteus maximus (GL Max) for the groups: Control (C), Pelvic immobilization (PI), Immobilization for 7 days and remobilized for another 7 (IR), Laser during the 7 days of pelvic immobilization (LDPI), and Laser for 7 days after the immobilization period (LAPI). The values correspond to mean±standard error of the mean $p < 0.05^*$ different from Control (C), $p < 0.05^{\#}$ different from PI and $p < 0.05^{\epsilon}$ different from IR and $p < 0.05^{\text{¥}}$ different from LDPI.

Cytokines

The main findings related to the concentration of interleukins (IL-6, IL-10) pointed out increases in the different experimental groups, with emphasis on the highest increase (27% IL-6 and 30% IL-10) in group PI, and the highest increase (9%) of IL-6 observed in the group LDPI. The IL-10 concentration was 27% higher in the group LDPI and 12% higher in the group LAPI ($p < 0.05$). With regards to TNF- α , the immobilization induced to an increase of 5% in the group PI and was 3% higher in the group IR. The groups submitted to PBM do not present differences from group C ($p > 0.05$), according to table 2.

Table 2: Analysis of the cytokines – 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF – α) and interleukin – 10 (IL-10) of the groups: Control (C), Pelvic immobilization (PI), Immobilization for 7 days and remobilized for another 7 (IR), Laser during the 7 days of pelvic immobilization (LDPI), and Laser for 7 days after the immobilization period (LAPI). The values correspond to mean±standard error

of the mean with $p < 0.05^*$ significance, different from Control (C), $p < 0.05^{\#}$ different from PI and $p < 0.05^{\epsilon}$ different from IR and $p < 0.05^{\xi}$ different from LDPI.

Groups	C	PI	IR	LDPI	LAPI
IL - 6	379.6±9	514,2±11*	478,8±8*. [#]	415,2±7*. ^{#,ε}	453,8±13*. ^{#,ε,ξ}
TNF - α	468,6±7	492,4±6*	483,8±5*	475,4±4 [#]	463,4±5 ^{#,ε,ξ}
IL - 10	374±8	529±11*	489,7±7*. [#]	475,2±9*. [#]	423,4±6*. ^{#,ε,ξ}

Discussion

It is observed in the literature that the PBM is being increasingly employed in the rehabilitation process of different disorders (Fritsch et al., 2016), it is worth pointing out that in the present study, and such therapeutics was applied in an unprecedented condition in respect to disuse models presented so far. This is how the present study sought to revert and/or minimize the deleterious effects caused by experimental pelvic immobilization in rats during the period of 7 days, which is a well-established period of time in regards to important alterations of the muscular tissue (Foresto et al., 2016).

When considered experimental muscular disuse involving the pelvic musculature, it was opted for PBM by Ga-Al-As laser therapy with wavelength of 830 nm, which besides reaching more deeper tissue, has been employed in studies focused on muscular tissue (Silva and Souza, 2016). It is worth pointing out that mitochondria have been considered the main photoreceptors inside muscular cells, which makes the PBM a highly beneficial strategy for the treatment of muscular tissue in a catabolic state (Ferraresi et al., 2012).

It was recently demonstrated that the PBM by LLLT (Ga-Al-As, 830 nm; 60mW, total, 180 s), when applied in atrophied muscles of rats, resulted in increase of satellite cells by incorporation of 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrDu), angiogenesis, besides favoring the maintenance of the diameter of the myofibrils in a disuse-by-suspension model (Nakano et al., 2009). With effect, the current study utilized a pelvic disuse model that resulted in muscular atrophy, and was submitted to PBM by LLLT (Ga-Al-As; 830 nm; 30mW, 7J/cm²; total, 112 s), which proved effective in altering the chemo-metabolic response in the different experimental conditions.

Highlighting the application of PBM during the immobilization period (LDPI), it is observed that the energy reserves (table 1), TP/DNA ratio (picture 3) and inflammatory cytokines (table 2) presented better results, even in constraint conditions. Even though the group submitted to PBM after the constraint period

(LAPI) presented expressive results, it is important to bear in mind that such group was already free from the immobilization model, and this fact can already trigger reversal mechanisms of atrophy by disuse by itself.

Studies reported that the demand for glucose is higher in muscles under atrophy conditions while glycolytic enzyme levels increase after space flight (Fitts et al., 2000). It was verified in the present study that the glycogenic reserves of the musculature involved in pelvic immobilization (PI) severely decreased down to 70%; such fact draws attention to the need of early intervention in similar conditions of wide muscular involvement.

With regards to the behavior of glycogen reserves for the group LDPI, compared to PI, the literature (Frits et al., 2016) points out that under conditions of energetic substrate depletion, such as muscular fatigue, the PBM may stimulate mitochondrial function, increase microcirculation and increase ATP synthase. However, recent studies have been investigating the use of PBM for increasing fatigue resistance and enhancing the energy metabolism of muscular tissue (Leal et al., 2010), while these findings may be applied both in performance enhancement, and recovery of muscles in disuse.

The energy reserves behavior of the groups LDPI and LAPI was strengthened by PBM, possibly due to the excitation of muscular fibers and direct modulation of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pump, which is ATP dependent (Allen et al., 2008). This way, the mitochondria that are surrounding T-tubules, as well as the Ca^{2+} cisternae may be stimulated by PBM, increasing then the ATP synthase. Nevertheless, a higher conductance of the Cl^- channels in T-tubules reduces the accumulation of K^+ on those tubules. Such condition favors the excitability and reestablishment of membrane potential of muscle fibers (Allen et al., 2008); Ferraresi et al., 2012).

Some studies have been presenting the total protein/DNA ratio as an indicator of the presence of muscular hyperplasia and/or hypertrophy, while the increase of DNA concentration points out to an increase of the number of muscular fibers. However, the increment of the total protein/DNA ratio would point out to an increase of transverse section area of the muscular fiber (Wen et al., 2014). It was verified in the present study that the PBM by LLLT during immobilization effectively enhanced the TP/DNA ratio (picture 3); such fact is due

to the activation of anti-catabolic mechanisms while the muscular tissue is still under effect of disuse generated by the pelvic model.

It is also important to emphasize that the group submitted to PBM after the immobilization period, even when freed of the imposed limitation by pelvic immobilization, did not present any significant change in the adductor brevis muscle in comparison of group PI, it was also slightly expressive in the gluteus maximus muscle, also compared to group PI. An interesting fact is that human subjects in bed rest and limbs immobilization reveal attenuated protein synthesis rates after 7 days (Glover et al., 2008), which supports the use of preventive strategies during this period.

It is stated that muscular atrophy may be triggered by a decrease of the protein synthesis rate, by an increase of degradation rate, or by a simultaneous decline of the synthesis combined with an increase of degradation (Gordon et al., 2013). This way, based on the results of TP/DNA from the present study, it is important to point out stress that only re-mobilization (IR) was ineffective in reverting muscle mass loss caused by the studied condition.

In this context, and because the group LAPI passed from a disuse condition to a functional condition without proper preparation of the involved musculature in pelvic immobilization, it is possible that such group suffered compromise in the protein synthesis resulting from the immobilization period, followed up by the increase in degradation resulting from locomotion, as there was no difference in the comparison between LAPI and IR. On the other hand, it is known that the group submitted to PBM during pelvic immobilization (LDPI), only had the muscular tissue prepared to resume its function, so that the group was submitted to euthanasia before resuming its function.

It was already described that in the muscular tissue of elder rates, the PBM (830 nm) presented positive results concerning the increase of the total transversal section area of the muscle and increase of the maturation of satellite cells in myoblasts and myotubes. Thus, it is suggested in the present study that the PBM may present better results when applied during the disuse phase, due to what was described by (Wen et al., 2014), the increment of the total protein/DNA ratio indicates increase of transverse section area of the muscular fiber.

Aiming to evaluate the inflammatory response in different experimental conditions in the present study, pro (IL-6 and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines were investigated. This way, it is known that cytokines influence in activity, differentiation, proliferation, survival time of the immune cell, as well as regulate the production and activity of other cytokines (Katharesan et al., 2016).

It is also known that reduced levels of IL-6 and TNF- α favor the activation of satellite cells and myotubes regeneration, while a chronically high production has been associated to loss of muscle mass, once it was recently verified that a higher muscular morphometry happened due to the fact that the proinflammatory cytokines were less present in young rats (Oliveira et al., 2011; Katharesan et al., 2016). This way, it is possible to deduce that PBM by LLLT can modulate cytokines involved in local and systemic inflammatory response (Souza, Silva 2016).

Bearing in mind what was aforementioned the levels of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in the group PI were 27% and 5% increased, respectively. It is also important to point out that one of the functions of these proinflammatory molecules is related to the beginning of the perpetuation of the inflammatory phase of regeneration. This may influence in the generation of oxygen and nitrogen free radicals, which act like molecular couriers of cellular signaling, and depending on the concentration, may or may not be beneficial to the affected tissue (Dinarello, 2011). In the same group (PI) the levels of IL-10 were 30% increased. The regain of mobility (IR) favored the decrease of the cytokines IL-6 and IL-10, although the levels were still higher than in Group C.

In regards to the groups submitted to PBM, it was verified that during immobilization (LDPI), the concentration of IL-6 was lower in comparison to the one that was submitted to PBM after immobilization (LAPI). Both groups that underwent PBM did not present significant alteration ($p > 0.05$) of TNF- α when compared to group C. IL-10 showed an increase of 27% in group LDPI, which reveals a decrease of proinflammatory activity and predominance of anti-inflammatory activity, such fact emphasizes the effectiveness of PBM in modulating pro and anti-inflammatory cytokines, as already demonstrated in other studies (Oliveira et al., 2011; Katharesan et al., 2016).

With regards to the modulation of the inflammatory process under skeletal muscular disorder conditions, the literature presents a consensus that the effectiveness may be increased when doses above 4J are utilized, both for superficial and deeper tissue, whereas for muscular tissue injuries in experimental nature, the presented dosage ranged from 4J to 10J (Souza and Silva, 2016).

The presented methodology in the current study is unprecedented and reflects an increasingly common question in clinical practice, which are pelvic disorders caused by fracturing, aging, postpartum, extended bed rest, immobilization of several muscular groups, and other ways that result in disorders in the pelvic region.

In short, the PBM was ineffective in reestablishing the glycogen reserves of the pelvic musculature. However, the TP/DNA ration emphasized that the PBM has its efficiency increased when applied during the immobilization process, and such result is followed up by an increased anti-inflammatory activity, demonstrated by a higher content of IL-10. The proinflammatory activity was predominant in the group LAPI, demonstrated by a higher content of IL-6.

Conclusion

The results of the present study demonstrate the importance of taking into account the moment to start intervening still during immobilization phase, for what it was verified that PBM during immobilization may mitigate protein catabolism and enhance the anti-inflammatory response, conditions that are favorable for the functional recovery in reduced time.

Future additional studies resulting from the present one may focus on other variables, such as immobilization and PBM time, frequency, muscles to be analyzed analysis procedures, age ranges, PBM dosimetry, as well as other resource that might be favorable to the functional recovery process of the pelvic region.

Bibliography

Allen DG, Lamb GD & Westerblad H. (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* **88**, 287–332.

Chowdhury P, Long A, Harris G, Soulsby ME & Dobretsov M. (2013). Animal model of simulated microgravity: a comparative study of hindlimb unloading via tail versus pelvic suspension. *Physiol Rep.* **1**, 1-11.

Dinarello, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* **117**, 3720-3732.

Ferraresi C, de Sousa MV, Huang YY, Bagnato VS, Parizotto NA & Hamblin MR. (2015). Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci.* **30**, 1259-67.

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

Fitts RH, Riley DR & Widrick JJ. (2000). Physiology of a microgravity environment. Invited review: microgravity and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **89**, 823–839.

Foresto CS, Paula-Gomes S, Silveira WA, Graça FA, Kettelhut Ido C, Gonçalves DA & Mattiello-Sverzut AC. (2016). Morphological and molecular aspects of immobilization-induced muscle atrophy in rats at different stages of postnatal development: the role of autophagy. *J Appl Physiol* (1985). **121**, 646-660.

Frara N, Abdelmagid SM, Tytell M, Amin M, Popoff SN, Safadi FF & Barbe MF. (2016). Growth and repair factors, osteoactivin, matrix metalloproteinase and heat shock protein 72, increase with resolution of inflammation in musculotendinous tissues in a rat model of repetitive grasping. *BMC Musculoskelet Disord.* **18**, 17-34

Fritsch CG, Dornelles MP, Severo-Silveira L, Marques VB, Rosso IA & Baroni BM (2016). Effects of low-level laser therapy applied before or after plyometric exercise on muscle damage markers: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lasers Med Sci.* **31**, 1935-1942.

Giler KW & Myers A. (1965). An improved diphenylamine method for the stimulation of deoxyribonucleic acid. *Nature.* **206**, 93-99.

Glover EI, Phillips SM, Oates BR, Tang JE, Tarnopolsky MA, Selby A, et al (2008). Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *J Physiol.* **586**, 6049–6061.

Gordon BS, Kelleher AR & Kimball SR. (2013). Regulation of Muscle Protein Synthesis and the Effects of Catabolic States. *Int J Biochem Cell Biol.* **45**, 2147–2157.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition, National Academies Press (US), 2011.

Guirro RRJ, Arruda EJ & Silva CA. (2014). Disuse induced by the spine

rectification vest: experimental study. *Fisioter Pesqui.* **21**, 21-26.

Katharesan V, Lewis MD, Vink R & Johnson IP. (2016). Disparate Changes in Plasma and Brainstem Cytokine Levels in Adult and Ageing Rats Associated with Age-Related Changes in Facial Motor Neuron Number, Snout Muscle Morphology, and Exploratory Behavior. *Front Neurol.* **7**, 7:191.

Lamboley CR, Wyckelsma VL, Perry BD, McKenna MJ & Lamb GD. (2016). Effect of 23-day muscle disuse on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ properties and contractility in human type I and type II skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol (1985).* **121**, 483-92.

Leal EC Junior, Lopes-Martins RA, de Almeida P, Ramos L, Iversen VV & Bjordal JM. (2010). Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol.* **108**, 1083–8.

Li TS, Shi H, Wang L & Yan C. (2016). Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Satellite Cell Proliferation and Apoptosis in Immobilization-Induced Muscle Atrophy in Rats. *Med Sci Monit.* **29**, 4651-4660.

Macedo AB, Moraes LHR, Mizobuti DS, et al (2015). Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. *PLoS ONE.* **10**, 1-14.

Mukai R, Horikawa H, Lin PY, Tsukumo N, Nikawa T, Kawamura T, Nemoto H & Terao J. (2016). 8-Prenylnaringenin promotes recovery from immobilization-induced disuse muscle atrophy through activation of the Akt phosphorylation pathway in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **311**, 1022-1031.

Mukai R, Matsui N, Fujikura Y, Matsumoto N, Hou DX, Kanzaki N, Shibata H, Horikawa M, Iwasa K, Hirasaka K, Nikawa T & Terao J. (2016). Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice. *J Nutr Biochem.* **31**, 67-76.

Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M & Yoshimura T. (2009). Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* **94**, 1005–1015.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR & Salomão R. (2011). Citocinas e Dor. *Rev Bras Anestesiol.* **61**, 255-265

Powers SK, Lynch GS, Murphy KT, Reid MB & Zijdewind I. (2016). Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue. *Med Sci Sports Exerc.* **48**, 2307-2319.

Rudrappa SS, Wilkinson DJ, Greenhaff PL, Smith K, Idris I & Atherton PJ. (2016). Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. *Front Physiol.* **25**, 7-361.

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

Siu LO, Russell JC & Taylor AW. (1970). Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology Published.* **28**, 234-236.

Souza MV & Silva MO. (2016). Laser therapy on locomotor disorders: a systematic review of experimental studies. *Rev Bras Med Esporte.* **22**, 76-82.

Stokes IA, McBride CA & Aronsson DD. (2008). Intervertebral disc changes in an animal model representing altered mechanics in scoliosis. *Stud Health Technol Inform.* **140**, 273-7.

Wen C, Chen Y, Wu P, Wang T & Zhou Y. (2014). MSTN mTOR and FoxO4 are involved in the enhancement of breast muscle growth by methionine in broilers with lower hatching weight. *PLoS One.* **9**, 1-11.

Yoshida S, Matsuzaki T & Hoso M. (2016). An immunohistochemical study of the sciatic nerve in a rat knee immobilization model. *J Phys Ther Sci.* **28**, 1116-9.