UNIVERSIDADE FEDERAL DE Së O CARLOS
CENTRO DE CIą NCIAS BIOLč GICAS E DA SAĐDE
PROGRAMA DE Pč S-GRADUA¢ ë O EM FISIOTERAPIA

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DIMINUÍDAS DE IGF-I E IGFBP-3, ATROFIA MUSCULAR E ALTERAÇÕES NO DESEMPENHO NEUROMUSCULAR CONTRIBUEM PARA A FRAQUEZA MUSCULAR EM INDIVÍDUOS HEMIPARÉTICOS CRÔNICOS.

MARCELA DE ABREU SILVA COUTO

Së O CARLOS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE Së O CARLOS
CENTRO DE CIą NCIAS BIOLč GICAS E DA SAÐDE
PROGRAMA DE Pč S-GRADUA¢ ë O EM FISIOTERAPIA

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DIMINUÍDAS DE IGF-I E IGFBP-3, ATROFIA MUSCULAR E ALTERAÇÕES NO DESEMPENHO NEUROMUSCULAR CONTRIBUEM PARA A FRAQUEZA MUSCULAR EM INDIVÍDUOS HEMIPARÉTICOS CRÔNICOS.

MARCELA DE ABREU SILVA COUTO

Disserta-«o apresentada ao Programa de P· s-Gradua-«o em Fisioterapia da Universidade Federal de S«o Carlos, como parte dos requisitos para a obten-«o do t²tulo de Mestre em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo

Apoio Financeiro: Bolsista de Mestrado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Cient²fico e Tecnol· gico (CNPq).

Së O CARLOS
2013

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária da UFSCar

S586cs

Silva-Couto, Marcela de Abreu.
Concentrações séricas diminuídas de IGF-I e IGFBP-3, atrofia muscular e alterações no desempenho neuromuscular contribuem para a fraqueza muscular em indivíduos hemiparéticos crônicos / Marcela de Abreu Silva Couto. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
60 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisioterapia. 2. Reabilitação neurológica. 3. Hemiparesia. 4. Atrofia muscular. 5. Marcadores biológicos. 6. Eletromiografia. I. Título.

CDD: 615.82 (20ª)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Banca Examinadora para Defesa de Dissertação de Mestrado de MARCELA DE ABREU SILVA COUTO, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo

(UFSCar)

Profa. Dra. Eloisa Tudella

(UFSCar)

Profa. Dra. Ana Raquel Rodrigues Lindquist

(UFRN)

Dedico este trabalho aos queridos que s«o a inspira-«o da minha vida e que somam for-as para prosseguir o caminho: meu amor Epaphras, meus valorosos pais, meus maravilhosos irm«os e meus imprescind²veis amigos.

AGRADECIMENTOS

A gratid«o ®uma pr§tica que enaltece o ser humano. £ a express«o ou o sentimento que tem o poder de gerar crescimento a todos ao redor e principalmente a quem ®grato. Deve ser praticada diariamente. £ a principal regra de etiqueta, por®m na correria da vida, muitas vezes, ou o tempo n«o nos permite, ou n«o verbalizamos ou simplesmente nos esquecemos. No entanto, tenho a rica oportunidade de formalizar meus sinceros agradecimentos ¨s pessoas que contribu²ram para esta realiza-«o.

Primeiramente, agrade-o ao meu amigo de todas as horas, aquele que conhece meus sentimentos e meus pensamentos, que sonda o meu cora-«o e me sustenta com sua destra fiel. Aquele que mudou a minha hist· ria e que d§ sentido ¨ vida e a quem posso chamar de PAI. Tudo ocorre por Ele e tudo ®para Ele. A Ele toda a Honra!

Agrade-o a minha fam²lia, que mesmo t«o distante nunca deixou de ser meu porto seguro. Meus queridos pais, sei que abdicaram de seus projetos e que se esfor-aram muito para proporcionar a realiza-«o do sonho que mudou radicalmente nossas vidas. Obrigada por representarem toda a for-a que preciso para seguir em frente, por terem me instru²do diante da Palavra de Deus e por terem me ensinado sobre o que ®eterno. Este ®o meu bem mais precioso! Marlon, Marcus, Lilian, Bia, voc°s s«o mais que irm«os! Juntos sempre! Amo muito voc°s!

Epaphras, esposo, amigo, namorado e quase um Fisioterapeuta! Tem sido meu maior parceiro desde o primeiro ano da faculdade. Voc° faz parte de todas as alegrias da minha vida e me incentiva e conforta nos momentos dif²ceis. Obrigada por sempre lutar para que as coisas aconte-am da melhor forma. Continuaremos a construir os sonhos, lado a lado.

Ao Thiago, o orientador que nunca deixou de ser um grande amigo. Obrigada por ter me ñadotadoò desde os tempos de apoio t®cnico e pela constru-«o do meu crescimento desde que cheguei na UFSCar. Foi uma caminhada e tanto! Obrigada por sua dedica-«o e por

compartilhar com excel°ncia a grande vis«o de um jovem e talentoso pesquisador, de car§ter admir§vel. Tenho o m®rito de ser sua primeira aluna.

ê minha amiga e super co-orientadora Christiane. Obrigada por ter sido incans§vel, por ter me ensinado, por ter me proporcionado as ferramentas necess§rias para me sentir capaz diante de um imenso desafio. Obrigada, pois com carinho, singeleza e maestria voc° me forjou com sua experi°ncia e sabedoria. Admiro-te!

ê querida Tania que me abriu as portas de uma nova realidade quando me recebeu no laborat· rio. Sem me esquecer da querida Esperanza que de uma forma muito especial me ajudou e muito me incentivou. Voc°s s«o grandes referencias a se seguir, e tenho o privil®gio de t°-las como personagens da minha hist· ria.

N«o tenho palavras para agradecer ¨ Professora Ana Beatriz, que com toda a paci°ncia e aten-«o do mundo elaborou a rotina para o processamento dos dados e com amizade ofereceu todo o suporte que precisei.

ê galera da velha guarda, dos tempos de bancada e apoio t®cnico: Sabrina, Jo«o, Rita, Gabriel, a flor e primeira dama Davinha, Carolina Colombiana, Paula, Mari, Cristina, e a dign²ssima Teresa.

ê s garotas superpoderosas: Gabi, Luiza, a mascotinha Dri e Carol, a quem destaco, pelo trabalho no mesmo projeto. Garota de fibra, parceira, ombro amigo, obrigada por sempre estar por perto! Amiga, obrigada por tudo! Foi muito bom trabalhar ao seu lado. Aos ICs, Araci, Carolzinha e Celso. Sem me esquecer do apoio da Ma²ra e da Teresa durante as coletas, ®claro! Formamos uma ñbelaò equipe! Voc°s s«o demais!

Aos inesquec²veis voluntários, pelos os quais devo respeito e amizade. Sem voc°s nada seria poss²vel!

Aos n«o menos importantes amigos Ferr (Gibi), Clara(...), Luciana artista, Ivana linda, Mel, Amilton, Nand«o, grande Ari, queridos Catarina e D· rio, L®o (vencedora, admiro-

te!), Rafaela, as Gis, Fabinho e Paula, Joice, Adrianinha e todas as vizinhas da neuropediatra, sempre sol²citos. Sou grata ao amigo Z® pela dedica-«o e por ter nos dado suporte no laborat· rio LaFar.

Agrade-o a Rosana, amiga do col®gio l§ de Tr°s Rios (RJ), grande reencontro! Serei sempre grata pela acolhida, hospedagem, ombro amigo, apoio, aten-«o. Amo-te amiga!

Aos professores, Stella, Rosana, Helo²sa, Tatiana e Anielle que direta e indiretamente contribu²ram para o trabalho. De igual forma, aos funcion§rios, amigos, professores da USE e toda a galera da P· s-Gradua-«o da Fisioterapia, parceiros das disciplinas e secret§rios. Um agradecimento especial aos alunos da gradua-«o.

Aos parceiros do CIDI, Dr Luiz, ao querido Marcinho e recepcionistas que muito contribu²ram para a an§lise da RMN.

Aos queridos Stefanas, Noemi, Salisa, S²ntique, D®bora, Lucas Gabriel, Marielisa, Sr. Jo«o e minha sogra querida Bernadete. Voc°s sempre pude contar com o apoio desta fam²lia aben-oada.Voc°s tamb®m fazem parte desta hist· ria!

A toda a comunidade da igreja Metodista em S«o Carlos, na qual recebo apoio e me sinto em casa. Marcia, Jeferson, Gabi, Nana, Rapha, Rodrigo, Larissas, ñLos hermanosò Jos®, £ric, Rosalia, J®ssica, Gabriel, Wil, Pr e Soninha. Voc°s est«o guardados no cora-«o pra sempre!

Agrade-o tamb®m a CAPES e a FAPESP que viabilizaram meus estudos, o projeto e os trabalhos que antecederam a este.

LISTA DE ABREVIATURAS

AST - Ćrea de sec-«o transversa

AVC - Acidente Vascular Cerebral

BF ï B²ceps femoral

CIMV ï Contra-«o isom®rica voluntßria mßxima

EEB ï Escala de equil²brio de Berg

IGFBP-3 - Prote²nas ligantes do fator de crescimento semelhante ¨ insulina 3

IGF-I - Fator de crescimento semelhante ¨ insulina I

J- Joules

m/s ï Metros por segundos

Nm ï Newton x metro

PT ï Pico de torque

RF ï Reto femoral

s ï Segundos

SS ï Semimembranoso e semitendinoso

ST ï Semitendinoso

T/m/s ï Tesla metro por segundo

TUG ï *Time up and go*

VI ï Vasto interm®dio

VL ï Vasto lateral

VM ï Vasto medial

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

Compara-»es apresentadas pelos colchetes. Observe o aumento da atividade do RF do MNP e do ST do MP durante a extens«o do joelho. Durante a flex«o, n«o houve diferen-as significativas entre os grupos.

SUMÁRIO

RESUMO

A fraqueza muscular ®caracterizada como uma importante causa da redu-«o da capacidade f²sica e funcionalidade, esta limita-«o ocorre devido ¨ diminui-«o da capacidade de gerar contra-«o voluntŠria dos grupamentos musculares no hemicorpo afetado. £ consequ°ncia de altera-»es morfofuncionais relacionadas aos aspectos neurais e musculares. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho neuromuscular, o volume muscular e a concentra-«o s®rica (CS) do fator de crescimento semelhante ¨ insulina 1 (IGF-1) e de sua prote²na ligante, IGFBP-3, em indiv²duos hemipar®ticos cr¹nicos. Para tal, um estudo transversal foi delineado. Quatorze sujeitos com hemiparesia cr¹nica foram submetidos a avalia-»es de funcionalidade realizada pelas ferramentas Escala de Equil²brio de Berg,Teste ñTimed Up & Goò (TUG) Adaptado, Teste de caminhada de 10 metros, Teste de Alcance Funcional, ôndice de Desempenho Motor de Fugl-Meyer, ôndice de atividade de vida diŠria de Barthel, Escala de Avalia-«o da Qualidade de Vida, Medical Outcomes Studyï 36 Health Status Measurement. Foram alocados no Grupo Hemipar®tico (GH; 12 homens). Sujeitos saudŠveis (Grupo Controle, GC) foram pareados por idade, g°nero, altura e ²ndice de massa corp· rea com o GH. Foram mensurados o volume dos m¼sculos reto femoral (RF), vasto medial (VM), vasto interm®dio (VI), vasto lateral (VL), b²ceps femoral (BF) e semitendinoso/ semimembranoso (SS). A CS de IGF-I e IGFBP-3 foi quantificada pelo m®todo de ELISA. O pico de torque (PT), trabalho e pot°ncia conc°ntricos e exc°ntricos, dos flexores e extensores do joelho, foram avaliados em dinam¹metro isocin®tico a 60Ús, de forma sincr¹nica ao registro da ativa-«o dos m¼sculos RF, VM, VL, BF e semitendinoso (ST). Para dados param®tricos, o teste T n«o pareado e Anova *two-way* seguida de Tukey foram utilizados para identificar diferen-as estat²sticas entre grupos e fatores (domin©ncia e condi-«o; membro par®tico: MP, membro n«o par®tico: MNP e membro controle: MC). Para dados n«o param®tricos foram utilizados o teste U de Mann Whitney seguido do ajuste de Bonferroni. O n²vel de signific©ncia de 5% foi considerado. O GH apresentou n²veis funcionais e as CSs de IGF-I e IGFBP-3 reduzidos em rela-«o ao GC. O GH apresentou atrofia seletiva dos m¼sculos VM, VI, BF e SS e tamb®m demonstrou a ativa-«o muscular alterada entre agonistas e antagonistas em rela-«o ao GC. Houve uma diminui-«o significativa do PT, trabalho e pot°ncia dos flexores e extensores do joelho em a-»es conc°ntricas e exc°ntricas no MP em rela-«o ao MNP e ao MC. Em conclus«o, indiv²duos hemipar®ticos apresentam fraqueza no MP decorrente de altera-»es no desempenho neuromuscular, incluindo diminui-«o do PT, pot°ncia e trabalho, e tamb®m devido a altera-»es no recrutamento de m¼sculos agonistas e antagonistas do movimento. Estas modifica-»es neurais s«o acompanhadas por atrofia seletiva de m¼sculos do quadr²ceps e dos isquiotibiais e por menores CSs de IGF-I e IGFBP-3.

Palavras-chave: Reabilita-«o Neurol· gica; Fisioterapia; Atrofia Muscular; funcionalidade; Biomarcadores; Eletromiografia.

ABSTRACT

Muscle weakness is characterized as a significant cause of reduced physical capacity and functionality, this limitation is due to the decreased ability to produce voluntary contraction of the muscle groups in the affected hemisphere. It is a consequence of morphological and functional changes related to neural and muscular aspects. The aim of this study was to evaluate the neuromuscular performance, muscle volume and Growth Factor Insulin-like I (IGF-I) serum concentration (SC) and its Binding Protein, IGFBP-3, in subjects with chronic hemiparesis. For such, a cross-sectional study was designed. Fourteen subjects with chronic hemiparesis were evaluated for functionality performed by assessment tools Berg Balance Scale Test, Timed Up & Go Adapted, Walk test 10 meters, Functional Reach Test, Fugl-Meyer Assessment, Barthel Index, Assessment of Quality of Life, Medical Outcomes Study-36 Health Status Measurement. The subjects were allocated in the hemiparetic group (HG, 12 men). Healthy subjects (control group, CG) were paired for age, gender, height and body mass index with HG. Rectus femoris (RF), vastus medialis (VM), vastus intermedius (VI), vastus lateralis (VL), biceps femoris (BF) and semitendinosus / semimembranosus (SS) muscle volume was measured. The SC IGF-I and IGFBP-3 was quantified by ELISA. The peak torque (PT), work and power during concentric and eccentric contractions of knee extensors and flexors were evaluated using an isokinetic dynamometer at 60Á/s, synchronously to record muscle activation RF, VM, VL, BF and semitendinosus (ST). For parametric data, the unpaired t test and ANOVA two-way followed by Tukey test were applied to identify statistical differences between groups and factors (dominance and condition; paretic limb: PL, non-paretic limb: NPL and control group CG). For nonparametric data was used the Mann Whitney U test followed by Bonferroni adjustment. The significance level of 5% was considered. The HG presented functional levels and CSs of IGF-I and IGFBP-3 reduced compared to the CG. The HG showed selective muscle atrophy of VM, VI, BF and SS, and also altered muscle activation between agonist and antagonist against the CG. There was a significant decrease in PT, work and power of the knee extensors and flexors for concentric and eccentric actions in the PL and NPL compared to the CG. In conclusion, hemiparetic group show weakness in the PL due to changes in neuromuscular performance, including decreased PT, power and work, and also due to changes in the agonist and antagonist muscle recruitment. These neural changes are accompanied by selective atrophy of quadriceps and hamstrings muscles and CSs decrease in IGF-I and IGFBP-3 serum concentrations.

Keywords: Neurological Rehabilitation, Physical Therapy, Muscular Atrophy; Functionality; Biomarkers, Electromyography.

APRESENTAÇÃO

Esta disserta-«o est§ organizada seguindo as recomenda-»es do Programa de P· s-Gradua-«o em Fisioterapia da UFSCar. Inicialmente ®apresentada uma breve contextualiza-«o e uma revis«o bibliogr§fica do problema a ser abordado e o objetivo geral do trabalho. A seguir, o manuscrito intitulado ñConcentra-»es s®ricas diminu²das de IGF-I e IGFBP-3, atrofia muscular e altera-»es no desempenho neuromuscular contribuem para a fraqueza muscular em indiv²duos hemipar®ticos cr¹nicosò ®apresentado. Este manuscrito ser§ submetido a revistas da §rea ap· s a defesa p¼blica da disserta-«o. Finalmente, uma conclus«o geral do trabalho, bem como as atividades cient²ficas desenvolvidas pela candidata, s«o apresentadas.

CONTEXTUALIZAÇÃO

O presente estudo ®a continuidade a uma linha de pesquisa j§ implantada no Laborat· rio de Plasticidade Muscular na UFSCar sobre a investiga-«o da plasticidade neuromuscular em sujeitos hemipar®ticos. Previamente, foi observado que estes indiv²duos podem apresentar d®ficits de for-a e pot°ncia independentemente de redu-«o no volume muscular (PRADO-MEDEIROS, 2012). Nesse sentido, o presente estudo teve o papel de responder novas perguntas que surgiram e assim, explorar aspectos inovadores, pois integra aspectos neuromusculares, moleculares e morfofuncionais. £ interessante ressaltar que estudos que avaliam a rela-«o existente entre essas altera-»es musculares decorrentes do AVC s«o raros na literatura, e na maioria dos casos, n«o incluem um grupo controle para compara-«o.

Al®m disso, n«o h§ na literatura um estudo que tenha avaliado a express«o de biomarcadores sangu²neos de controle da massa muscular, como o fator de crescimento semelhante ¨ insulina-I (IGF-I) e suas prote²nas ligantes (IGFBPs) para a popula-«o em quest«o. T«o pouco foi tra-ada uma correla-«o entre suas concentra-»es s®ricas, volume e desempenho muscular de hemipar®ticos cr¹nicos. Esta correla-«o ® importante, pois atrav®s dos biomarcadores do trofismo muscular ser§ poss²vel obter informa-»es sobre condi-»es sist°micas relacionadas ao m½sculo esquel®tico.

Este estudo contribuiu para a cria-«o de uma linha de base para futuras interven-»es terap°uticas, como o treinamento resistido, de flexibilidade ou proprioceptivo. Tamb®m focou o uso de biomarcadores moleculares (IGF-I e IGFBP-3) que respondem ¨ atividade f²sica, trazendo informa-»es relevantes para a reabilita-«o destes indiv²duos.

O estudo atende a uma determina-«o da Organiza-«o Mundial da Sa¼de que preconiza a preven-«o e o desenvolvimento de a-»es em todos os n²veis de assist°ncia relacionados ao AVC em car§ter priorit§rio.

REVISÃO DA LITERATURA

Alterações neuromusculares decorrentes do Acidente Vascular Cerebral (AVC)

O AVC ® atualmente uma das maiores causas de incapacidade f²sica em adultos no mundo, segundo a Organiza-«o Mundial da Sa¼de (2011). Estima-se que aproximadamente 65% dos sobreviventes possuem hemiparesia por no m²nimo um ano ap· s o AVC, ou seja, mesmo ap· s a fase de recupera-«o funcional espont©nea os indiv²duos ainda apresentam d®ficits neuromusculares (PAK E PATTEN, 2008).

Estudos que avaliam as habilidades funcionais dos hemipar®ticos demonstram que h§ comprometimento do equil²brio din©mico de agonistas e antagonistas, tanto em membros superiores como em membros inferiores, o que resulta em limita-«o funcional (PRADO-MEDEIROS *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2009; HORSTMAN *et al.*, 2009), al®m das disfun-»es sensoriais e cognitivas (OPARA *et al.*, 2010).

Em rela-«o ¨ limita-«o funcional, a queixa principal de indiv²duos com hemiparesia ®a restri-«o da marcha que est§ relacionada ao processo de diminui-«o da autonomia e da independ°ncia para atividades de atividade di§rias (JONSDOTTIR e CATTANEO, 2007, BILLINGER *et al*., 2010). Desta forma, o envolvimento social e o retorno ¨ ocupa-«o laboral tamb®m est«o comprometidos.

Al®m das restri-»es de participa-«o nas atividades de vida di§ria, h§ altera-»es relacionadas ao efeito de intera-»es medicamentosas, a depend°ncia de um cuidador, adapta-«o ¨ cadeira de rodas ou bengala e a dificuldade de acessibilidade, devido a barreiras arquitet¹nicas (HORSTMAN *et al.*, 2009; JONSDOTTIR e CATTANEO, 2007, BILLINGER *et al*., 2010; PAK E PATTEN, 2008; MAKI et al., 2006). Consequentemente, estas mudan-as afetam o

indiv²duo no aspecto psicossocial e estas mudan-as resultam na redu-«o da qualidade de vida (LIMA *et al.* 2008; BRUCKI, 2003). Assim, consideramos que voltar a deambular ®uma aquisi-«o importante para o indiv²duo com hemiparesia. Esta considera-«o salienta a relev©ncia de estudos que investigam as altera-»es de membros inferiores de indiv²duos hemipar®icos cr¹nicos.

Ap· s a ocorr°ncia do AVC, preju²zos significativos como fraqueza muscular podem ser observados. Esta fraqueza muscular ®consequ°ncia de altera-»es morfofuncionais relacionados aos aspectos neurais e musculares. Entretanto, h§ poucos estudos que descrevem essas altera-»es conforme a compara-«o com indiv²duos saud§veis. H§ uma tend°ncia dos estudos focarem os aspectos neurais (McKENZIE *et al.,* 2007, PATTEN *et al*., 2004; GOWLAND *et al.,* 1992 ; KNUTSSON *et al*., 1997), por®m, os aspectos intr²nsecos ao m¼sculo tamb®m deveriam ser considerados de igual forma (PRADO- MEDEIROS et al. 2012, TSENG *et al.,* 2010;; PAK E PATTEN, 2008; HORSTMAN *et al.,* 2008; ENZINGER *et al.,* 2008;).

Modificações dos componentes da força muscular geram fraqueza em indivíduos pós-AVC

A fraqueza muscular ®uma das principais causas da redu-«o da funcionalidade p· s-AVC. £ a inabilidade de gerar n²veis normais de for-a, ou seja, a diminui-«o da capacidade de gerar contra-«o voluntária dos grupamentos musculares no hemicorpo envolvido na les«o (PRADO-MEDEIROS *et al.*, 2012; ENZINGER *et al.,* 2008). Tais altera-»es s«o atribu²das n«o apenas ¨ redu-«o da ativa-«o de unidades motoras (McKENZIE *et al.,* 2007; PAK E PATTEN, 2008), mas tamb®m a modifica-»es inerentes ao m¼sculo, como sugerido por estudos pr®vios (HAFER-MACKO *et al.,* 2008; LIEBER, STEINMAN, BAR ASH, 2004). Dentre as mudan-as estruturais

sugeridas destacam-se o aumento desordenado de tecido conjuntivo e atrofia da fibra muscular (HAFER-MACKO *et al.*, 2008; LIEBER, STEINMAN, BAR ASH, 2004).

Estudos transversais com °nfase na pr§tica cl²nica t°m demonstrado que os d®ficits de for-a e funcionalidade em indiv²duos hemipar®ticos n«o necessariamente est«o relacionados com a atrofia muscular (SUNNERHAGEN et al., 1999; SHARP e BROWER, 1997; PLOUTZ-SNYDER et al., 2006). Um recente estudo do nosso laborat· rio mostrou que d®ficits de for-a extensora e flexora de joelho, em membros acometidos de pacientes hemipar®ticos cr¹nicos, n«o s«o necessariamente acompanhados de diminui-«o do volume dos m½sculos par®ticos (PRADO-MEDEIROS et al., 2012).

Jorgensen e colaboradores (2001) relataram a diminui-«o da massa magra em membros par®tico e n«o-par®tico nos primeiros dois meses ap· s les«o encef§lica, no entanto, a massa muscular do membro n«o-par®tico recupera-se gradativamente conforme a fun-«o deste hemicorpo ® restabelecida. Entretanto, a tem§tica ainda ® controversa, sendo que mais investiga-»es s«o necess§rias para esclarecer a rela-«o entre atrofia muscular e os d®ficits de for-a nestes indiv²duos.

Em contra partida, alguns estudos fazem uso de bi· psias musculares, medindo a §rea de sec-«o transversa da fibra muscular par®tica. Seus resultados variam entre aus°ncia de atrofia muscular e grandes diferen-as na §rea da fibra entre m½sculos par®ticos e n«o-par®ticos. Tais resultados s«o pouco conclusivos, pois n«o representam o m½sculo em toda a sua extens«o. Al®m disto, a compara-«o entre os estudos torna-se dif²cil pela n«o uniformidade na escolha dos m½sculos de an§lise, uma vez que h§ diferentes propor-»es de tipos de fibra de acordo com o m½sculo investigado, e da variabilidade de metodologias adotadas (HACHISUKA, UMEZU, OGATA, 1997; LIEBER, STEINMAN, BAR ASH *et al*, 2004; CARIN-LEVI *et al*, 2006;

PRADO-MEDEIROS *et al,* 2012). Assim, estudos b§sicos que focaram a avalia-«o da morfologia muscular s«o controversos (MCKENZIE *et al.,* 2009; MATHENY *et al.,* 2009; HAFER-MACKO *et al.,* 2008; CHRISTENSEN *et al.,* 2008; GIOVANNINI 2008; BERG *et al*, 2007; BONDANELLI *et al.,* 2006; JASSAL *et al.,* 2005; ROSENDAL *et al.,* 2002). Enfim, existem controv®rsias na literatura relacionada aos poss²veis mecanismos moleculares e morfol· gicos que acarretam altera-»es sens· rio-motoras e, portanto, levam ¨ paresia p· s-AVC.

Biomarcadores relacionados aos aspectos neurais e musculares

Estudos que integram an§lises do desempenho muscular, morfologia e funcionalidade com biomarcadores moleculares do trofismo muscular n«o s«o encontrados na literatura. Neste sentido, o fator de crescimento semelhante ¨ insulina-I (IGF-I) e seus ligantes (IGFBP-3) s«o descritos como importantes mediadores das adapta-»es neuromusculares.

O fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I)

Nos per²odos pr®e p· s-natal, o desenvolvimento dos tecidos ®amplamente regulado pelo horm¹ nio do crescimento, produzido na hip· fise, que por sua vez, induz a produ-«o do fator de crescimento semelhante ¨ insulina-I (IGF-I) pelo f²gado. O IGF-I ® o mediador prim§rio da maioria das respostas do horm¹ nio de crescimento (NINDL *et al.,* 2010; MATTSSON *et al.,* 2008; SHERRYLINE *et al.,* 2008; JUUL *et al.,* 1995). £ um pept²deo formado por 70 amino§cidos com peso molecular de 7,47 kD, sendo estruturalmente homologo ¨ insulina (MATHENY *et al.,* 2008; JURIMAE E JURIMAE, 2007; CAPPOLA et al, 2001). Na vida adulta, a concentra-«o de IGF-I sist°mico ® ainda importante para a manuten-«o dos tecidos, sendo um importante horm¹ nio anab· lico mediador do crescimento e reparo dos tecidos

(GOLDSPINK *et al.,* 2007, SCICCHITANO, RIZZUTO, MUSARď *et a.l,* 2009, CAPPOLA *et al.,* 2001).

V§rias isoformas de IGF-I j§ foram descritas. A isoforma IGF-IEa ®produzida pelo f²gado e possui a-«o sist°mica. Outra isoforma tamb®m importante ®a IGF-IEc ou MGF (Fator de Crescimento Mec©nico); trata-se de uma isoforma produzida pelo m½sculo esquel®tico e pode ser regulada pela atividade muscular, em especial a sobrecarga mec©nica. Ambas possuem a fun-«o de estimular a s²ntese proteica bem como a ativa-«o, prolifera-«o e diferencia-«o das c®lulas sat®lite no m½sculo esquel®tico (NINDL *et al.,* 2010; MATTSSON *et al.,* 2008; COPELAND *et al.,* 2002;JUUL *et al.,* 1995).

Os pept²deos IGF-I associam-se ¨ fam²lia de prote²nas plasm§ticas transportadoras denominadas prote²nas ligantes do fator de crescimento semelhante ¨ insulina (IGFBPs). Apenas 10% do IGF-I circula livremente no plasma; os 90% restantes s«o transportados conectados ¨s prote²nas ligantes (DAAL *et al.,* 2001; JOGIE-BRAHIM, FELDMAN e OH, 2008).

Proteínas ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBPs)

As prote²nas ligantes do fator de crescimento semelhante ¨ insulina (IGFBPs) s«o respons§veis pelo seu transporte no plasma e pelo aumento na vida m®dia dos IGFs. As IGFBPs modulam as a-»es do IGF-I podendo tanto potencializ§-las quanto inib²-las (MATTSSON *et al.,* 2008; JOGIE-BRAHIM, FELDMAN, OH, 2008; DAAL *et al.,* 2001;)

Seis IGFBPs foram clonadas e sequenciadas: IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 e 6. Todas apresentam elevado grau de especificidade e de afinidade para IGF-I, exce-«o da IGFBP-2 e IGFBP-6, que apresentam maior afinidade para IGF-2 (ELLOUMI *et al.,* 2005; DENLEY *et al* 2005; ROSENDAL *et al.,* 2002;). Por outro lado, a IGFBP-3 ®primariamente respons§vel pela

manuten-«o dos n²veis de IGF-I circulantes, sendo a IGFBP-3 a forma mais abundante na circula-«o sangu²nea. Integra cerca de 75 a 90 % das IGF-I ao complexo tern§rio com peso molecular de 150 kDa que consiste em IGFBP-3, a sua subunidade §cido l§bil e IGFs. Este complexo ®regulado pelo horm¹nio de crescimento sintetizado e secretado pela hip· fise anterior (SHERRYLINE *et al.,* 2008).

O papel do IGFBP-3 junto ao IGF-I ® muito importante, pois apresenta atua-«o compensat· ria, reduzindo os n²veis s®ricos de IGF-I impedindo a prolifera-«o tecidual indevida, ou seja, altos n²veis de IGF-I e baixos n²veis de IGFBP-3 traduzem um maior risco do desenvolvimento de alguns tipos de c©ncer (HANKISON *et al.,*1998). Dentre eles, os c©nceres de mama (KAAKS *et al.,* 2001), pulm«o, colo-retal, ovariano (DOUGLAS *et al.,* 2010).

Este biomarcador tem sido investigado concomitantemente ao IGF-I, devido ¨ correla-«o positiva entre ambos os fatores e o desempenho f²sico. Altos n²veis s®ricos de IGF-I e baixos n²veis s®ricos de IGFBP-3 significam que h§ uma maior disponibilidade de IGF-I circulante. Este evento pode ocorrer em situa-»es de fadiga muscular por ñ*overtraining*ò (BENHADDAD *et al.,* 1999; ELLOUMI *et al.,* 2005).

Relação entre IGF-I e IGFBP-3 com trofismo e força musculares

Como visto, tanto o IGF-I e o IGFBP-3 s«o marcadores sist°micos que respondem ¨s altera-»es do m¼sculo esquel®tico (GLASS *et al.,* 2011; GOLDSPINK *et al.,* 2007). Sendo assim, s«o importantes nos estudos sobre a regenera-«o de diferentes tipos de les»es (SUETTA, CLEMMENSEN, ANDERSEN, 2010), treinamentos resistidos (ROSENDAL *et al.,* 2002), miopatias progressivas (SCICCHITANO, RIZZUTO, MUSARd' *et al.,* 2009), menopausa

(JURIMAE *et al.,* 2010; JASSAL *et al.,* 2005) e envelhecimento (GIBNEY *et al.,* 2007; BERG *et al.,* 2007).

Foi mostrado que a express«o aumentada ou a administra-«o ex· gena de IGF-I resultam no aumento da massa muscular e no atraso do in²cio da sarcopenia relativa ¨ idade (ADAMO E FARRAR et al.,2006; SCICCHITANO, RIZZUTO, MUSARd' *et al.,* 2009). Em um estudo em popula-«o idosa, Onder e *et al.* (2006) relataram que a baixa concentra-«o s®rica de IGF-I correlaciona-se com a fraqueza muscular. Giovannini *et al.* (2008) afirmam que o aumento do IGF-I s®rico ®importante para o aumento da for-a dos m½sculos esquel®ticos.

Cappola e colaboradores (2001) encontraram a mesma rela-«o estudando popula-«o de mulheres em fase p· s-menopausa. J§ foi demonstrado que os aumentos dos n²veis s®ricos de IGF-I s«o correlacion§veis com o aumento de for-a dos m½sculos extensores do joelho ap· s um treino resistido moderado (JURIMAE & JURIMAE, 2007; JURIMAE *et al*., 2010).

Suetta, Clemmensen e Andersen (2010) mostraram uma rela-«o entre os aumentos da express«o do IGF-I sist°mico (IGF-IEa) e muscular (MGF) e a §rea de sec-«o transversa da fibra muscular em idosos ap· s treinamento resistido. Jurimae *et al.* (2010) demonstraram que o aumento da express«o dos n²veis de RNAm de IGF-I est§ associado ao aumento dos n²veis s®ricos do IGF-I e da IGFBP-3, bem como o aumento do pico de torque em mulheres idosas ap· s um treinamento resistido.

Apesar dos n²veis de IGF-I e IGFBP-3 terem sido investigados em v§rias popula-»es, nenhum estudo avaliou tais n²veis em indiv²duos hemipar®ticos. Em resumo, podemos concluir que IGF-I e IGFP-3 s«o biomarcadores que executam uma boa correla-«o com as vari§veis relacionadas ao desempenho muscular e que trazem respostas esclarecedoras quanto aos mecanismos moleculares de controle da massa muscular em indiv²duos hemipar®ticos cr¹ nicos.

OBJETIVO

Objetivos gerais:

Identificar fatores que levam ¨ fraqueza em membros inferiores de indiv²duos hemipar®ticos, considerando o volume muscular e o desempenho neuromuscular de flexores e extensores do joelho, e tamb®m quantificar a concentra-«o s®rica de fatores relacionados ao trofismo muscular e neural, como o IGF-I e IGFBP-3.

Objetivos específicos:

Descrever a condi-«o funcional e a qualidade de vida de indiv²duos hemipar®ticos cr¹nicos, considerando velocidade da marcha, desempenho motor, equil²brio e independ°ncia nas atividades de vida di§ria;

Investigar se indiv²duos hemipar®ticos apresentam atrofia muscular, quando comparados a indiv²duos saud§veis. Em caso de atrofia, identificar quais m¼sculos foram mais afetados;

Mensurar a concentra-«o s®rica de IGF-I e IGFBP-3;

Avaliar a for-a, considerando o pico de torque, o trabalho e a pot°ncia, durante a extens«o e a flex«o do joelho nos modos conc°ntrico e exc°ntrico;

Avaliar a ativa-«o muscular durante o pico de torque durante a extens«o e a flex«o do joelho nos modos conc°ntrico e exc°ntrico.

Verificar a relev©ncia cl²nica de poss²veis correla-»es entre concentra-»es s®ricas e o desempenho neuromuscular e a atrofia.

MANUSCRITO

Concentrações séricas diminuídas de IGF-I e IGFBP-3, atrofia muscular e alterações no desempenho neuromuscular contribuem para a fraqueza muscular em indivíduos hemiparéticos crônicos.

Autores: Marcela de Abreu Silva-Couto[1], MS, Christiane L. Prado Medeiros[2], MS, PhD, Ana Beatriz de Oliveira[3], PhD, Carolina C. Alcantara[1], MS, Araci T. Guimar«es[1], Tania de Fatima Salvini[2], MS, PhD, Rosana Mattioli[4], MS, PhD, Thiago Luiz de Russo[1], PhD.

1. Laborat· rio de Pesquisa em Fisioterapia Neurol· gica, Departamento de Fisioterapia (DFisio), Universidade Federal de S«o Carlos (UFSCar), S«o Carlos, SP, Brasil.

2.Laborat· rio de Plasticidade Muscular, DFisio, UFSCar, S«o Carlos, SP, Brasil.

3.Laborat· rio de Pesquisa em Cinesiologia Cl²nica e Ocupacional, DFisio, UFSCar, S«o Carlos, SP, Brasil.

4.Laborat· rio de Neuroci°ncias, DFisio, UFSCar, S«o Carlos, SP, Brasil.

Autor para correspondência:

Thiago Luiz de Russo. Departamento de Fisioterapia. Universidade Federal de S«o Carlos ï UFSCar. Rodovia Washington Lu²s, km 235, Monjolinho, S«o Carlos, S«o Paulo, Brasil, CEP 13565-905. Telefone: +551633519578 / Fax: +551633612081; E-mail:

thiagoluizrusso@gmail.com ; marcela.deabreu@yahoo.com.br .

Título curto: Altera-»es morfofuncionais e moleculares do indiv²duo hemipar®tico cr¹nico.

INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) ®um grave problema de sa¼de p¼blica em todo o mundo (McKENZIE *et al.*, 2007; PAK E PATTEN, 2008). Atualmente ®considerado a terceira causa de · bito em pa²ses industrializados (OMS, 2012) e uma das principais causas de perda na funcionalidade em adultos (McKENZIE *et al.*, 2007; PAK E PATTEN, 2008). A assist°ncia destes indiv²duos requer gastos alt²ssimos. Por exemplo, apenas nos EUA cerca de 65,5 bilh»es de d· lares foram gastos para o atendimento de indiv²duos que sofreram AVC em 2008 (ROSAMOND *et al.*, 2008). Deste modo, a Organiza-«o Mundial de Sa¼de (2011) recomenda o desenvolvimento de pol²ticas p¼blicas relacionadas ao AVC com o objetivo de promover a-»es priorit§rias nos diferentes n²veis de aten-«o ¨ sa¼de.

Cerca de um ter-o dos sobreviventes de AVC passam por um longo e complexo programa de reabilita-«o. Esses indiv²duos s«o incapazes de realizar atividades de vida di§ria, como caminhar, subir e descer degraus, realizar cuidados pessoais e trabalhar (ROSAMOND *et al.*, 2008; GILES e ROTHWELL, 2008; MAKI *et al*., 2006). Considerando o quadro cl²nico de hemipar®ticos cr¹nicos, a fraqueza destaca-se dentre as principais altera-»es j§ descritas na literatura.

A fraqueza muscular ® caracterizada como uma importante causa da redu-«o da funcionalidade, esta limita-«o ocorre devido ¨ realiza-«o inadequada do movimento e a diminui-«o da capacidade de gerar contra-«o voluntária dos grupamentos musculares no hemicorpo afetado (PRADO-MEDEIROS *et al.*, 2012; ENZINGER *et al.*, 2008) £ consequ°ncia de altera-»es morfofuncionais relacionadas as aspectos neurais, por exemplo, espasticidade, incoordena-«o motora, dissinergia entre m¼sculos agonistas e antagonistas, padr«o anormal de recrutamento e fadiga das unidades motoras, altera-«o da propriocep-«o e feedback para o

movimento McKENZIE *et al.,* 2007, PATTEN *et al*., 2004; GOWLAND *et al.,* 1992 ; KNUTSSON *et al*., 1997). Concomitantemente, ocorrem as altera-»es dos aspectos musculares que incluem diminui-«o do desempenho muscular, atrofia, aumento do tecido conjuntivo e adiposo, da resist°ncia da matriz extracelular e da tens«o das fibras musculares, al®m da mudan-a no fen· tipo destas fibras (PRADO MEDEIROS *et al*., 2012; RAMSAY *et al.,* 2011; HAFER-MACKO *et al.,* 2008; LIEBER, STEINMAN, BAR ASH, 2004). Entretanto, h§ poucos estudos que descrevem essas altera-»es conforme a compara-«o com indiv²duos saud§veis (PRADO MEDEIROS *et al*., 2012). H§ uma tend°ncia dos estudos focarem os aspectos neurais, por®m, os aspectos intr²nsecos ao m¼sculo tamb®m deveriam ser considerados de igual forma. Ainda, existem controv®rsias na literatura relacionada aos poss²veis mecanismos moleculares e morfol· gicos que acarretam altera-»es sens· rio-motoras e, portanto, levam ¨ paresia p· s-AVC.

O esclarecimento de poss²veis mecanismos relacionados com a fraqueza decorrente do AVC requer a combina-«o de t®cnicas distintas complementares, como o uso de ferramentas cinesiol· gicas, de imagem, funcionais e tamb®m moleculares. Neste sentido, a investiga-«o de biomarcadores permite esclarecer como mudan-as moleculares podem acarretar em altera-»es morfofuncionais. O fator de crescimento semelhante ¨ insulina-I (IGF-I) vem sendo associado ao trofismo muscular, bem como a sobreviv°ncia e sinaptog°nese de neur¹nios (CLEMMONS, 2009) CARRO *et al*., 2005). £ dito como mediador prim§rio da maioria das respostas do horm¹nio de crescimento para o desenvolvimento dos tecidos no organismo humano (ABERG, 2010, GIBNEY *et al.,* 2007; ADAMO e FARRAR, 2006, DENLEY *et al.,* 2005). A sua isoforma de a-«o sist°mica produzida pelo f²gado atua sobre os sistemas musculoesquel®tico (NINDL *et al.,* 2010; MATTSSON *et al.,* 2008; SHERRYLINE *et al.,* 2008; JUUL *et al.,* 1995) e nervoso central (CARRO *et al*., 2005; SMEDT *et al*. 2011; BENDEL *et al*., 2010)

O IGF-I estimula a s²ntese proteica bem como a ativa-«o, prolifera-«o e diferencia-«o das c®lulas sat®lite no m¼sculo esquel®tico (NINDL *et al*., 2010; SCICCHITANO, RIZZUTO, e MUSARď, 2009; MATTSSON *et al*., 2008; COPELAND *et al.*, 2002), promovendo o aumento da massa muscular e reduzindo, assim, o processo de atrofia. (GLASS, 2011; NINDL *et al.*, 2010; MATTSSON *et al.*, 2008; SHERRYLINE *et al.*, 2008). Destaca-se o fato de que o IGF-I ® regulado pela ativa-«o muscular, em especial pela sobrecarga mec©nica (CAPPOLA *et al*., 2001, ROSENDAL *et al.*, 2002). O IGF-I ® capaz de ultrapassar a barreira hematoencef§lica e no Sistema Nervoso Central, mediante ¨ est²mulos como por exemplo exerc²cios f²sicos, o IGF-1 ® capaz de exercer a-»es neuroprotetoras, aumentar a neurog°nese hipocampal e induzir neoangiog°nese, atuando desta forma como uma neurotrofina (KOOIJMAN, *et al.* 2009; CARRO *et al*., 2005).

Por ser um fator de crescimento, a a-«o do IGF-I ® rigorosamente controlada por uma fam²lia de prote²nas plasm§ticas transportadoras denominadas prote²nas ligantes do fator de crescimento semelhante ¨ insulina (IGFBPs). As IGFBPs, especialmente a IGFBP-3, potencializam ou inibem a atua-«o do IGF-I, sendo importantes para o transporte e o aumento da vida m®dia do IGF-I (GLASER *et al*, 2010; MATTSSON *et al.*, 2008; JOGIE-BRAHIM, FELDMAN, OH, 2008; DAAL *et al.*, 2001;). O papel da IGFBP-3 junto ao IGF-I ® muito importante, pois apresenta atua-«o compensat·ria, reduzindo as concentra-»es s®ricas de IGF-I e impedindo a prolifera-«o tecidual indevida, tendo em vista que altos n²veis de IGF-I e baixos n²veis de IGFBP-3 traduzem um maior risco do desenvolvimento de tecidos neopl§sicos (HANKISON *et al*., 1998; KAAS *et al*., 2010; DOUGLAS *et al*, 2010). Este biomarcador tem

sido investigado concomitantemente ao IGF-I, devido ¨ correla-«o positiva entre ambos e o desempenho f²sico em organismos saud§veis.

A investiga-«o destes biomarcadores ® importante para o embasamento de novas estrat®gias farmacol· gicas e para o entendimento dos mecanismos de a-«o dos recursos f²sicos, como por exemplo, treino de for-a, treino aer· bio e alongamento, que s«o frequentemente usados na reabilita-«o de indiv²duos com hemiparesia. Assim, estudos que enfoquem o entendimento das altera-»es sens· rio-motoras e dos mecanismos adaptativos moleculares e teciduais decorrentes do AVC e suas rela-»es com o desempenho em tarefas funcionais s«o relevantes para o desenvolvimento de estrat®gias terap°uticas eficazes e seguras para a reabilita-«o desses indiv²duos. Deste modo, a hip· tese do presente estudo ®que indiv²duos hemipar®ticos cr¹nicos apresentam menores concentra-»es s®ricas de IGF-I e IGFBP-3 relacionadas com d®ficits funcionais e do desempenho muscular e atrofia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos, desenho experimental e participantes

O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes e normas de pesquisa em seres humanos (Resolu-«o 196/1996, do Conselho Nacional de Sa¼de) e aprovado pelo Comit° de £tica da UFSCar (Parecer n¼mero: 278/2011). Foi realizado um estudo transversal, em que o software GPower 3,1 foi utilizado para o c§lculo amostral. Inicialmente, um estudo piloto foi realizado e a vari§vel isocin®tica pico de torque (PT) exc°ntrico foi considerada para o calculo amostral. Com um *Power* maior que 0,8, chegou-se ao n¼mero de 14 sujeitos por grupo. O poder estat²stico ao final do estudo foi calculado utilizando a mesma vari§vel (Power = 0. 95; tamanho

do efeito = 1.7). O grupo experimental denominado de Grupo Hemipar®tico foi composto por 14 hemipar®ticos cr¹nicos devido a AVC unilateral. O grupo denominado Controle foi composto por 14 indiv²duos saud§veis pareados aos sujeitos hemipar®ticos por idade (Ñ3 anos), g°nero e ²ndice de massa corporal. Um fisioterapeuta experiente realizou uma entrevista seguida de anamnese para triagem dos participantes. Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Critérios de inclusão e exclusão

Os seguintes crit®rios de inclus«o foram usados na sele-«o de participantes hemipar®ticos: diagn·stico m®dico atestando o AVC unilateral; AVC classificado como hemorr§gico ou isqu°mico; 6 meses ou mais p·s-AVC; idade entre 50 e 70 anos; ambos os g°neros; espasticidade inferior ao n²vel 3 da Escala de Ashworth Modificada (BOHANNON 1987), de modo que o indiv²duo fosse capaz de movimentar a alavanca do equipamento isocin®tico; apresentar n²veis 2, 3, ou 4 de acordo com Functional Ambulation Category (WADE, 1992); pontua-«o m²nima no Mini Exame do Estado Mental de acordo com a escolaridade do volunt§rio (BRUCKI, 2003; FOLSTEIN, 1975). Para a inclus«o dos sujeitos saud§veis foi considerado um escore maior que 8 no Question§rio de Atividade F²sica Basal, indicando que os indiv²duos n«o eram sedent§rios (BAECKE *et al.*,1982; FLORINDO *et al*., 2004).

Os crit®rios de exclus«o para ambos os grupos foram: sinais cl²nicos de insufici°ncia card²aca; arritmia; angina; aneurisma; hipertens«o descontrolada; *diabetes mellitus*; doen-as reum§ticas; doen-as hep§ticas; diagn·stico de c©ncer; interven-»es que influenciassem na resposta do IGF-I como terapias de reposi-«o hormonal ou medicamentos para controle da hipercolesterolemia; pacientes que n«o podem doar sangue ou que t°m alguma altera-«o na coagula-«o sangu²nea; ²ndice de massa corporal acima de 28 Kg/m^2 o que interferiria na

confiabilidade do sinal eletromiogr§fico; doen-as ortop®dicas ou outras doen-as neurol· gicas; defici°ncias graves cognitivas ou de comunica-«o; indiv²duos com hist· rico de les»es no joelho ou membros inferiores; presen-a de dor durante o procedimento.

O fluxograma amostral do estudo ® apresentado na figura 1. Vinte e oito sujeitos foram inclu²dos no estudo. O Grupo Hemipar®tico foi formado por 12 homens e 2 mulheres (*n total* = 14). Em rela-«o ao tipo de AVC, 6 indiv²duos apresentaram o tipo isqu°mico e 8 hemorr§gico. O tempo m®dio p· s-AVC foi de 7.31Ñ6 anos (m²nimo: 1; m§ximo: 12 anos). Em virtude do pareamento amostral, o Grupo Controle tamb®m foi formado por 12 homens e 2 mulheres (*n total* = 14). Todos os participantes completaram os procedimentos. Por®m, devido a interfer°ncias na aquisi-«o do sinal eletromiogr§fico, dois indiv²duos de cada grupo foram exclu²dos durante a an§lise desta vari§vel.

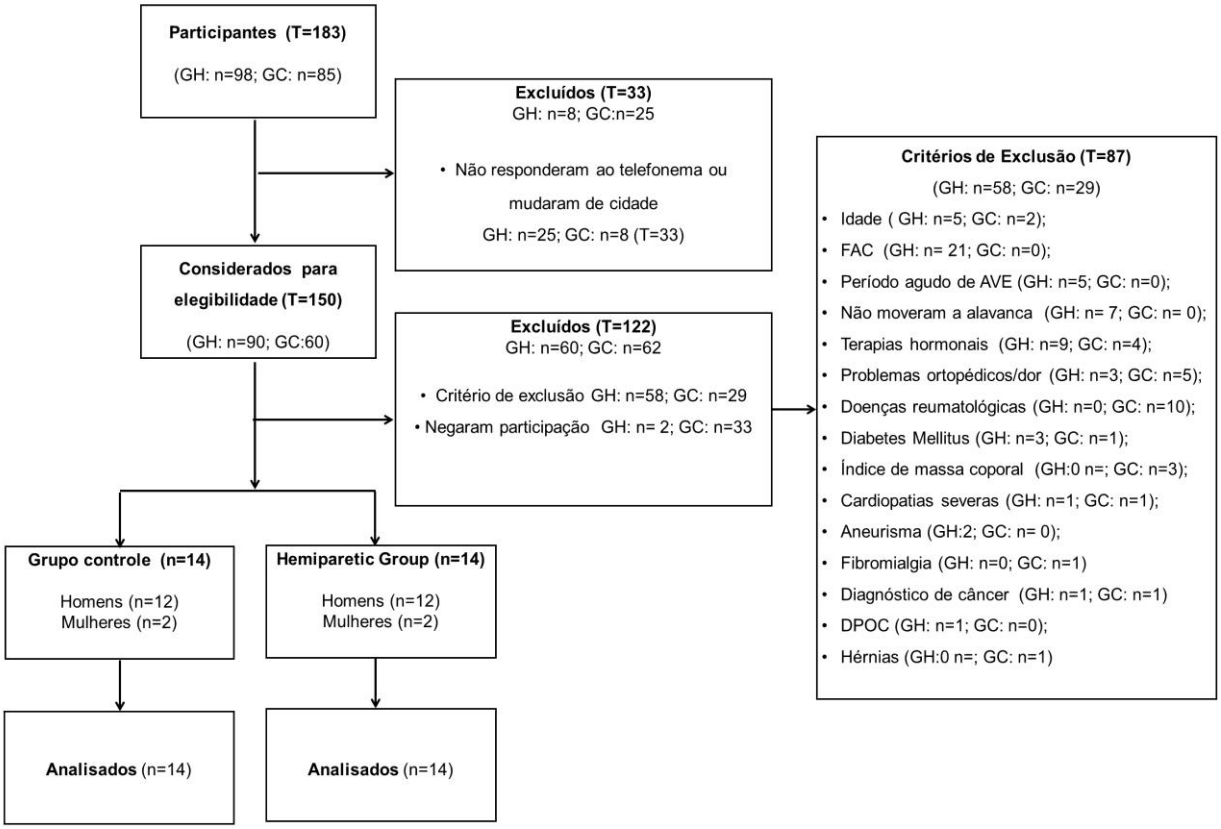


Figura 1. ***Fluxograma amostral do estudo.*** GH: grupo hemipar®tico; GC: grupo controle. FAC: *Functional Ambulation Category*, DPOC: doen-a pulmonar obstrutiva cr¹nica.

Procedimentos e Instrumentos de Medida

Foi realizada uma sele-«o da amostra a partir da abordagem de indiv²duos da comunidade local e do acesso ¨s listas de espera de indiv²duos hemipar®ticos cr¹nicos, em servi-os ambulatoriais locais e indiv²duos saud§veis em programas de revitaliza-«o f²sica da comunidade. O convite para a participa-«o no estudo foi estabelecido mediante contato por telefone, caso o sujeito concordasse, o agendamento de uma triagem que consistia em question§rios para

avalia-«o do n²vel de atividade e da condi-«o f²sica e testes funcionais era realizada na mesma semana. Ao serem enquadrados nos crit®rios de inclus«o, ap· s 5-7 dias ocorreu a realiza-«o do exame de resson©ncia magn®tica. Um dia ap· s este exame, a coleta de sangue foi realizada, seguida pela avalia-«o isocin®tica e eletromiogr§fica.

Avaliação do nível de atividade e funcionalidade dos grupos

Com o intuito de caracterizar em detalhe a amostra estudada, n²vel de atividade dos indiv²duos, equil²brio e mobilidade foram avaliados pelos seguintes escalas ou testes: **1)** ***Escala de Equilíbrio de Berg (EEB).*** Escores menores ou iguais a 44 indicam aumento de quedas para indiv²duos hemipar®ticos (BERG *et al*., 1995; BLUM E KORNER-BITENSKY, 2008). 2) ***Teste "Timed Up & Go" (TUG) Adaptado.*** Escores maiores ou iguais a 13,5 segundos indicam uma redu-«o da funcionalidade (FARIA et al, 2009; JONSDOTTIR e CATTANEO, 2007). 3) ***Teste de caminhada de 10 metros.*** Conforme a velocidade da marcha os sujeitos s«o classificados em Deambulador domiciliar (<0,4m/s), Deambulador comunit§rio limitado (0,4 ï 0,8 m/s) e Deambulador (>0,80) (JONSDOTTIR e CATTANEO, 2007, BILLINGER *et al*., 2010). 4) ***Teste de Alcance Funcional*** (TAF) - Determina o quanto o indiv²duo ®capaz de deslocar seu corpo dentro do limite de estabilidade anterior durante uma tarefa de alcance em p® Deslocamentos menores que 15 cm indicam fragilidade do paciente e risco de quedas (GAI, GOMES, Nč BREGA, RODRIGUES, 2010; DUNCAN *et al*., 1990).

Al®m disso, desempenho motor, atividades da vida di§ria e a qualidade de vida no Grupo Hemipar®tico foram avaliadas conforme instrumentos citados respectivamente. O ***Índice de***

Desempenho Motor de Fugl-Meyer foi aplicado somente em membros inferiores (FUGL-MEYER; 1975; MAKI *et al*., 2006). Escores menores 50 s«o interpretados como um comprometimento motor severo, 50-84 (acentuado), 85-94 (moderado) e maiores que 94 (leve) (DUNCAN et al., 1994). O ***Índice de atividade de vida diária de Barthel*** considera um escore total ®de 20 pontos, quanto maior a pontua-«o, maior a independ°ncia (MAHONEY, 1965; HSUEH P, LEE M., e HSIEH C, 2001). Finalmente, a ***Escala de Avaliação da Qualidade de Vida*.** Escores ®de 49 a 245 pontos, e quanto maior a pontua-«o melhor a qualidade de vida (LIMA *et al.* 2008).

O Grupo Controle foi submetido ¨ escala espec²fica para identificar o n²vel de qualidade de vida. O teste ***Medical Outcomes Study–36 Health Status Measurement (SF-36)*** Os resultados que s«o interpretados mediante a atribui-«o de escores para cada quest«o, os quais s«o transformados numa escala de zero a 100, sendo que zero corresponde ao ñmaior comprometimentoò e 100 ao ñnenhum comprometimentoò (WARE e SHERBOURNE, 1992; WARE, 2000).

Ressonância Magnética Nuclear

As imagens dos m½sculos quadr²ceps e isquiotibiais foram obtidas por exames de Resson©ncia Magn®tica Nuclear usando o equipamento Magneton C 28876 (Siemens), com uma intensidade de campo de 0,35 Tesla (T) e gradiente de for-a de 55 T/m/s. Conforme a metodologia de Tracy *et al*., (2003), imagens Axiais (T1) foram obtidas a partir do c¹ ndilo femoral at®a espinha il²aca ©ntero-superior com cortes de 9 mm e lacunas de 1 mm de espessura, tempo de propaga-«o de 26 ms, e tempo de repeti-«o 430 ms. O tamanho das matrizes de 256 x

256 pixels foram obtidas em cada imagem da coxa. Com o objetivo de estimar o volume muscular, as §reas de sec-«o transversa (ASTs) foram mensuradas a cada 3,2 cent²metros, isto ®, a cada 4 cortes, a partir do ponto de refer°ncia distal (c¹ ndilo femoral). As ASTs foram medidas em cent²metros quadrados e para isso foi utilizado o software Axiovision vers«o 3.0 (Carl Zeiss Inc, Thornwood, New York). A gordura intermuscular foi exclu²da dos contornos. Em alguns cortes distais onde n«o havia continuidade entre os feixes musculares, as ASTs individuais de cada feixe muscular foram delineadas e somadas para obter AST total naquele n²vel de corte. Em cada sec-«o, cada m¼sculo foi medido 3 vezes pelo mesmo investigador cego quanto ao grupo ou ¨ hemiparesia/domin©ncia. O valor m®dio das tr°s medidas foi considerado para an§lise. O volume dos m¼sculos em cada sec-«o axial (em cent²metros c¼bicos) foi calculado atrav®s da multiplica-«o dos valores da AST do m¼sculo pela espessura de corte (3,2 cm). Para esta medida foi utilizada a f· rmula de cone truncado segundo Tracy et al, 2003. Os volumes dos cortes axiais e dos intervalos entre cada corte foram somados para a obten-«o dos valores de volume muscular estimados dos m¼sculos quadr²ceps: Reto Femoral (RF), Vasto Medial (VM), Vasto Lateral (VL), Vasto Interm®dio (VI) e Isquiotibiais: B²ceps Femoral (BF) e Semitendinoso e Semimembranoso (SS). Estes m¼sculos foram mensurados individualmente conforme as refer°ncias anat¹ micas de Fleckenstein, Crues and Reimers (1996).

Coleta e preparo da amostra de sangue

As coletas foram realizadas imediatamente antes do teste isocin®tico. O procedimento foi realizado por um profissional qualificado. Doze mililitros de sangue foram coletados da veia antecubital do membro n«o par®tico ou do membro dominante (agulha 25x8mm) e reservadas em

um tubo est®ril de 8.5 ml (Marca BD VacutanierÈ, com pol²mero gel separador). Em seguida, as amostras foram expostas por trinta minutos em temperatura ambiente para o processo de coagula-«o e ent«o foram centrifugadas em 3000 x g por 15 minutos. O armazenamento ocorreu em temperatura menor que -20 graus C®sius (BERG *et al*., 2007). Todas as amostras foram processadas posteriormente em um ¼nico imunoensaio (CHRISTENSEN *et al*., 2008; BERG *et al*., 2007; ELESEN *et al*., 2007).

Mensuração da concentração sérica de IGF-I e IGFBP-3 por ELISA

As concentra-»es s®ricas de IGF-I e IGFPB-3 foram mensuradas pelo m®todo ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), usando kits de alta sensibilidade (QuantikineÈ HS, R&D Systems, Mineapolis, USA) segundo as recomenda-»es do fabricante. As medidas s®ricas foram realizadas em duplicatas. As amostras foram dilu²das e aplicadas a uma curva de dosagens. Uma lavadora autom§tica com precis«o de dispensa-«o maior que 98% para um volume de 300Õl (TP-WASHER; ThermoPlateÈ) foi utilizada para lavagens das microplacas. As leituras das amostras foram feitas por espectrofot¹metro de microplacas (TP Reader Basic; ThermoPlateÈ) ajustado para 450 nm.

Avaliação isocinética

M§ximas contra-»es conc°ntricas e exc°ntricas a 60 graus por segundo (Ás) foram obtidas por meio da mensura-«o do torque m§ximo durante movimentos de flex«o e extens«o do joelho

pelo equipamento dinam¹ metro isocin®ico Biodex System III (Biodex Medical Systems, Shirley, New York). Os participantes estavam sentados em uma cadeira reclinada 5 graus. O tronco, quadril e coxas foram firmemente estabilizados no dinam¹ metro com cinto de seguran-a. O eixo de rota-«o do bra-o de alavanca do dinam¹ metro foi alinhado com o c¹ ndilo lateral do f°mur e a extremidade inferior foi estabilizada por faixa fixada ao bra-o de alavanca do dinam¹ metro 2 cm acima do mal®olo lateral.

Para as medidas de for-a considerou-se 0 grau para a extens«o total do joelho e a amplitude de movimento foi limitada entre 20 e 90 graus. Antes de cada modo, os participantes realizaram tr°s testes com resist°ncia m²nima para familiariza-«o com o equipamento e o teste. Ap· s intervalo para descanso de 1,5 minutos, eles realizaram cinco contra-»es m§ximas. O teste muscular exc°ntrico (modo reativo) foi realizado conforme o protocolo utilizado para o teste conc°ntrico. O in²cio do teste dos indiv²duos do Grupo Hemipar®ico ocorreu a partir do membro n«o par®ico. A escolha do membro a ser testado em indiv²duos do Grupo Controle foi realizada por randomiza-«o. Durante os testes conc°ntricos e exc°ntricos, os participantes foram instru²dos a empurrar e puxar t«o forte e t«o r§pido quanto poss²vel em toda a amplitude de movimento. As vari§veis pico de torque (PT), pot°ncia, e trabalho foram registrados pelo software Biodex System III. O valor de PT mais elevado dentre os 5 testes foi utilizado. O valor de pot°ncia e trabalho foi correspondente ao PT considerado. A pot°ncia foi derivada do trabalho (torque x dist©ncia) ao longo do tempo de cada tentativa. Somente as tentativas em que alcan-aram o crit®rio de velocidade foram consideradas.

Aquisição da atividade muscular por eletromiografia

Durante a avalia-«o isocin®tica, dados de eletromiografia foram coletados bilateralmente dos m¼sculos quadr²ceps e seus antagonistas, de forma sincronizada com o dinam¹metro isocin®tico. Foi utilizado 1 eletrodo de superf²cie adesivo descart§vel de Ag/AgCl com pr®-amplificador, de 1 cm de di©metro em cada polo, com 20 mm de separa-«o entre eles (Miotec, Porto Alegre, RS, Brasil). As §reas da pele onde foram posicionados os eletrodos foram tricotomizadas, abrasadas e limpas com §lcool antes do posicionamento. Os eletrodos foram fixados paralelos ¨ orienta-«o das fibras musculares, de acordo com as diretrizes do SENIAM (HERMENS *et al.,* 1999). Para o m¼sculo quadr²ceps foram coletados sinais eletromiogr§ficos do RF, VM e VL. Para os isquiotibiais foram coletados sinais eletromiogr§ficos para o BF e semitendinoso (ST). O eletrodo de refer°ncia (auto-adesivo descart§vel de silicone e gel, 5x5cm; VALUTRODE È) foi fixado na protuber©ncia radial.

Para o registro dos sinais eletromiografia, foi utilizado um sistema de 8 canais (800 C, EMG System do Brasil, S«o Jos® dos Campos, SP) com um hardware com placa de convers«o anal·gico-digital (A/D) de 12 bits, amplificador com ganho de 1000 vezes, filtro passa banda de 20 a 500 Hz (Butterworth de 4Ûordem), raz«o de rejei-«o de modo comum (RRMC) > 100 dB, taxa de ru²do do sinal < 3 ÕV (Root Mean Square) e imped©ncia de 109 Ohms. A frequ°ncia de amostragem foi estabelecida em 1000 Hz por canal.

Finalmente, os sinais eletromiogr§ficos foram quantificados em Root Mean Square a partir do m®todo de janelamento (dura-«o de 20ms e sobreposi-«o de 50%). Sequencialmente foram normalizados pela Contra-«o Voluntária M§xima (CVM) de cada m¼sculo. Para cada repeti-«o foi calculado o pico de ativa-«o, apresentado em porcentagem (%CVM). O maior pico

identificado para cada m¼sculo foi utilizado para representar a ativa-«o muscular. O processamento foi realizado a partir de rotinas desenvolvidas no software MatLab (v.7.0.1, MathWorks Inc., Natick, MA, EUA).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade (Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente). A an§lise Anova two-way foi realizada para encontrar poss²veis intera-»es entre fatores, incluindo membros inferiores (dominante e n«o dominante) e condi-«o (par®tico, n«o par®tico e controle) e identificar diferen-as entre os grupos (par®tico, n«o par®tico e controle). Considerando a domin©ncia de membros inferiores, n«o houve diferen-a significativa entre os membros do grupo controle, portanto, um conjunto de dados incluindo ambos os membros foi utilizado como controle. O Teste post hoc Tukey foi aplicados para identificar diferen-as estat²sticas entre as vari§veis dependentes volume muscular, PT, pot°ncia e trabalho, normalizados pelo peso corporal (PC). O teste T n«o pareado foi utilizado para verificar diferen-as entre grupos nas vari§veis IGF-I, IGFBP-3, Teste TUG, Escala de Equil²brio de Berg, Teste de caminhada de 10 m e Teste de Alcance Funcional. O teste Kruskal Wallis foi utilizado para verificar diferen-as entre grupos na vari§vel Ativa-«o Muscular e o Mann Whitney U seguido do ajuste de Bonferroni (p= 0.017) foram utilizados para as vari§veis dependentes de ativa-«o muscular. A correla-«o de Pearson foi utilizada para verificar as rela-»es entre concentra-«o s®rica de IGF-I e IGFBP-3, IGFBP-3 e teste de 10m, IGFBP-3 e vari§veis isocin®ticas, vari§veis isocin®ticas e teste de 10 m. A correla-«o de Spearman foi utilizada para verificar as rela-»es entre a vari§vel ativa-«o muscular e ©ndice do Desempenho Motor Fugl-

Mayer. Os valores da diferen-a entre m®dias dos grupos foram expressos em porcentagem e foram apresentados como d®ficit. Um alfa de 0.05, com um intervalo de confian-a de 95% foram utilizados para todos os testes, que foram realizados com o software SPSS, vers«o 10.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

RESULTADOS

Caracterização dos Sujeitos

Níveis de atividade, mobilidade, funcionalidade e qualidade de vida

Conforme a Tabela 1, o Grupo Controle apresentou os seguintes valores referentes ¨s dimens»es ***Medical Outcomes Study–36 Health Status Measurement (SF-36)***: capacidade funcional (96,78Ñ4,05); aspectos f²sicos (96,4 Ñ 8,7); dor (91,7 Ñ 17,5); estado geral de sa¼de (74,2 Ñ 1); vitalidade (71,8 Ñ 21,9); aspectos sociais (88,4 Ñ 21,4); aspectos emocionais (75,9 Ñ 21,4) e sa¼de mental (83,2 Ñ11,6). Em rela-«o ao Grupo Hemipar®tico, o escore m®dio do ûndice do Desempenho Motor Fugl-Mayer foi de 28,4 Ñ 1,9 (84%), Os valores da *Functional Ambulation Category* foram: n²vel 4 (n=7) e n²vel 5 (n=7). Os valores da Escala de Ashworth Modificada foram: quadril: 0 (n=11), 1(n=1), 1+ (n=2); joelho: 0 (n=6), 1 (n=5), 1+ (n=2), 2 (n=1); tornozelo: 0 (n=3), 1 (n=8), 1+ (n=1), 2 (n=2). A pontua-«o da Escala de Equil²brio de Berg do Grupo Hemipar®tico foi de 47 Ñ 5,15 com redu-«o significativa do equil²brio quando comparado ao Grupo Controle (**Tabela 1**, p<0,05).

Houve um aumento significante no tempo do teste TUG realizado pelo Grupo Hemipar®tico quando comparado ao Grupo Controle (**Tabela 1**, p<0,05). Em rela-«o ao teste de caminhada de 10 m, o Grupo Hemipar®tico apresentou uma diminui-«o na velocidade quando comparado ao Grupo Controle (Tabela 1, p = 0,05). O valor m®dio do ûndice de Barthel indicou um alto n²vel de independ°ncia durante as atividades de vida di§ria (18,8 Ñ 1). O valor m®dio da Escala de Qualidade de Vida Espec²fica para Indiv²duos Hemipar®ticos foi de 189,6 Ñ 27 (77, 38%) indicando um n²vel moderado de qualidade de vida.

Tabela 1 – Descrição demográfica e funcional dos grupos.

Variáveis	Grupo Controle (n=14)	Grupo Hemiparético (n=14)	Valor P
Idade (anos)	61,6 Ñ7,8	61 Ñ8	0,818
Altura (m)	1,7 Ñ0,1	1,6 Ñ0,1	0,835
Peso Corporal (Kg)	73,1 Ñ13,9	70,3 Ñ8,8	0,963
Índice de Massa Corporal	26,3 Ñ3,9	25,8 Ñ3,2	0,679
Escala de Equilíbrio de Berg	55,5 Ñ0,8	47 Ñ5,1*	0,001
TUG Test (s)	8,8 Ñ1,6	26,2 ± 17,9 *	0,001
Teste de caminhada 10 m (m/s)	1,9 Ñ0,3	0,8 Ñ0,5*	0,001
Alcance Funcional	55,5 Ñ5,4	21,8 Ñ10,1*	0,001

Volume dos músculos flexores e extensores do joelho

A **Figura 2** ®representativa da mensura-«o do volume muscular dos m½sculos quadr²ceps e isquiotibiais nos Grupo Controle e Grupo Hemipar®tico. Nas imagens de Resson©ncia Magn®tica Nuclear ®poss²vel identificar o aumento do tecido conjuntivo e a atrofia nos m½sculos do membro par®tico. Os gr§ficos demonstram as diferen-as do volume muscular entre os grupos. Houve diferen-a significativa no volume muscular total do quadr²ceps (p=0,018) e dos isquiostibiais (p=0,014) somente entre membros par®tico e controle. Valores m®dios do volume muscular total do quadr²ceps: membro controle (1263 Ñ387,3 cm^3), membro n«o par®tico (1194 Ñ277,9 cm^3), membro par®tico (961,2 Ñ236,6 cm^3) e dos isquiotibiais membro controle (706,9 Ñ 239,2 cm^3), membro n«o par®tico (592,6 Ñ 130,2 cm^3), membro par®tico (519,2 Ñ 132,2 cm^3). Uma diminui-«o significativa no volume dos m½sculos VM (p=0,01; d®ficit de 34,9%), VI (p=0,04; d®ficit (31,5%), BF (p=0,006; d®ficit 13,5%) e SS (p=0,04; d®ficit 12,8%) do membro

par®tico comparado ao membro controle foi identificada. Houve a atrofia seletiva dos m½sculos VM, VI, BF e SS nos membros par®ticos. Os m½sculos RF e VL apresentaram volumes semelhantes ao controle (RF: p = 0,08; e VL: p = 0,08, respectivamente). N«o foram observadas diferen-as entre os m½sculos do membro n«o par®tico e o membro controle e entre o membro par®tico e o membro n«o par®tico (p>0,05).

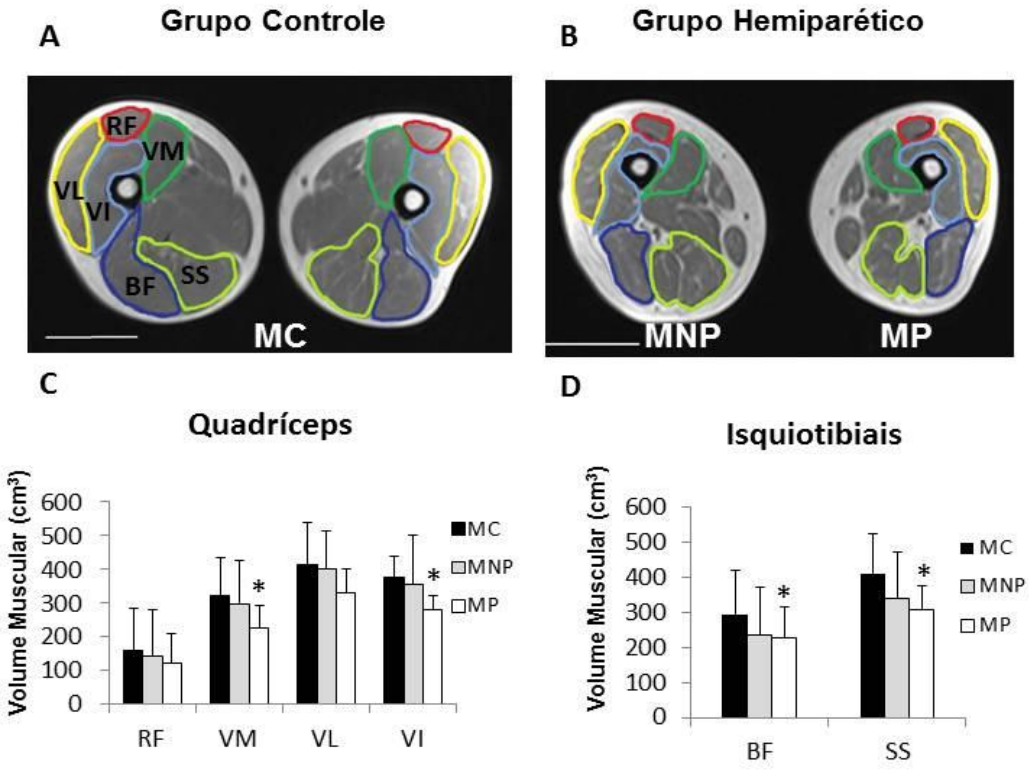


Figura 2. ***Volume dos músculos extensores e flexores do joelho.*** MC: membro controle; MNP: membro n«o par®tico; MP: membro par®tico. A) Figura representativa da RNM do grupo controle (GC); B) Figura representativa da RNM do Grupo Hemipar®tico (GH). C) Volume dos m½sculos Quadr²ceps (reto femoral - RF, vasto medial - VM, vasto interm®dio - VI, vasto lateral - VL); D) Volume dos m½sculos isquiotibiais (semitendinoso e semimembranoso - SS e b²ceps femoral - BF); *p<0,05 comparado ao GC. Note a atrofia seletiva dos m½sculos VM, VI, BF e SS nos membros par®ticos. Barra: 15cm.

Concentrações séricas de IGF-I e IGFBP-3

As concentra-»es s®ricas de IGF-I e IGFBP-3 est«o diminu²das no Grupo Hemipar®tico quando comparadas ao Grupo Controle (p=0,03 e p=0,002, respectivamente; **Fig. 3**). Observou-se uma forte correla-«o entre as concentra-»es s®ricas de IGF-I e de IGFBP-3 no Grupo Hemipar®tico (R=0,8; p = 0,01).

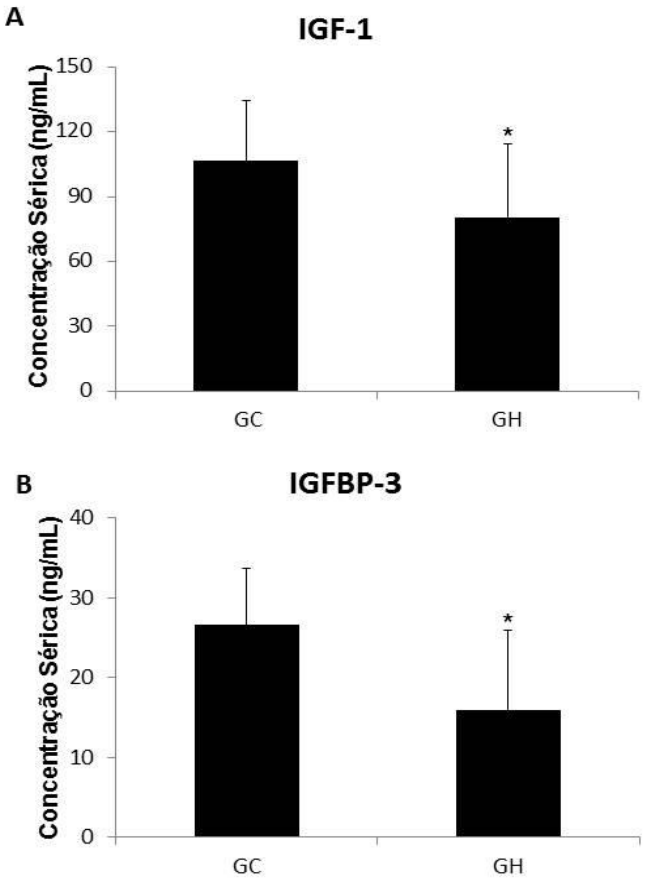


Figura 3. ***Concentrações séricas de IGF-I e IGFBP-3***. GC: grupo controle; GH: Grupo Hemipar®tico. *p<0,05: comparado a GC. Observe que o GH apresentou menores concentra-»es s®ricas de IGF-I e IGFBP-3 em compara-«o ao GC.

Torque e Ativação muscular

Os valores das vari§veis isocin®ticas s«o apresentados na **Tabela 2**. Houve uma diminui-«o significativa do PT, trabalho e pot°ncia dos m¼sculos flexores e extensores do joelho do membro par®tico em rela-«o ao membro n«o par®tico e ao membro controle nos modos conc°ntrico e exc°ntrico (p<0,05; **Tabela 2**). N«o houve diferen-a das vari§veis isocin®ticas investigadas entre membro n«o par®tico e membro controle (p>0,05; **Tabela 2**).

Em rela-«o ¨ ativa-«o muscular em contra-»es conc°ntricas (**Fig. 4**) foi demonstrado que durante a extens«o h§ um maior pico de ativa-«o do m¼sculo RF nos membro n«o par®tico e membro par®tico comparado a membro controle (p<0,001; **Fig. 4**). Observa-se ainda o aumento do maior pico de ativa-«o do m¼sculo ST no membro par®tico durante a extens«o conc°ntrica em compara-«o ao membro n«o par®tico e o membro controle (p<0,05; **Fig. 4**). Em rela-«o ¨ flex«o conc°ntrica, foi detectado um aumento do maior pico de ativa-«o dos m¼sculos RF, VM e VL no membro par®tico em rela-«o ao membro n«o par®tico e ao membro controle (p<0,05; Fig. 4). Durante a extens«o exc°ntrica houve maior ativa-«o do m¼sculo RF do membro n«o par®tico em rela-«o ao membro controle e membro par®tico (p<0,001; **Fig. 5**). Al®m disso, foi observado um aumento do maior pico de ativa-«o do m¼sculo ST durante a extens«o exc°ntrica no membro par®tico em rela-«o ao membro controle (p = 0,001; **Fig. 5**). N«o houve diferen-a entre os membros durante a flex«o exc°ntrica (p>0,05; **Fig. 5**).

Tabela 2 – ***Desempenho Muscular Isocinético***

	CONCÊNTRICA					
	Extensão			Flexão		
	Pico de Torque (Nm/PC)	Trabalho (J/PC)	Potência (Watts/PC)	Pico de Torque (Nm/PC)	Trabalho (J/PC)	Potência (Watts/PC)
MC	161. 7 Ñ45.8	760.7 Ñ216.1	715.65 Ñ203.6	104,1 Ñ26,1	420.7 Ñ147.6	409.3 Ñ141.9
MNP	169.9 Ñ62.5	720.6 Ñ292.2	691.5 Ñ279.2	91.7 Ñ20.9	488.6 Ñ99.2	455.7 Ñ92.1
MP	87.1 Ñ33.9*À	331.1 Ñ146*À	370 Ñ35.4*À	42.3 Ñ13.8*À	189.5 Ñ61.8*À	192.5 Ñ55.2*À
	EXCÊNTRICA					
	Extensão			Flexão		
	Pico de Torque (Nm/PC)	Trabalho (J/PC)	Potência (Watts/PC)	Pico de Torque (Nm/PC)	Trabalho (J/PC)	Potência (Watts/PC)
MC	198.5 Ñ 43.5	849.5 Ñ194.2	1262.4 Ñ515.7	207.4 Ñ51.9	848.4 Ñ207.3	908.6 Ñ190.2
MNP	163.3 Ñ67	719.5 Ñ270.4	759.8 Ñ308	153.9 Ñ40	658.9 Ñ216.5	699.4 Ñ278.4
MP	104.8 Ñ48.4*À	414.2 Ñ200.9*À	509.6 Ñ206.6*À	135.4 Ñ28.5*À	587.1 Ñ183.3*À	642.4 Ñ122.8*À

MC: membro controle, MNP: membro n«o par®tico, MP: membro par®tico. PC: Peso corporal. *: diferen-a em rela-«o ao Grupo Controle (p<0,05). †: diferen-a em rela-«o ao membro n«o parético (p<0,05). Nm: Newton x metro; J: Joules.

Figura 4

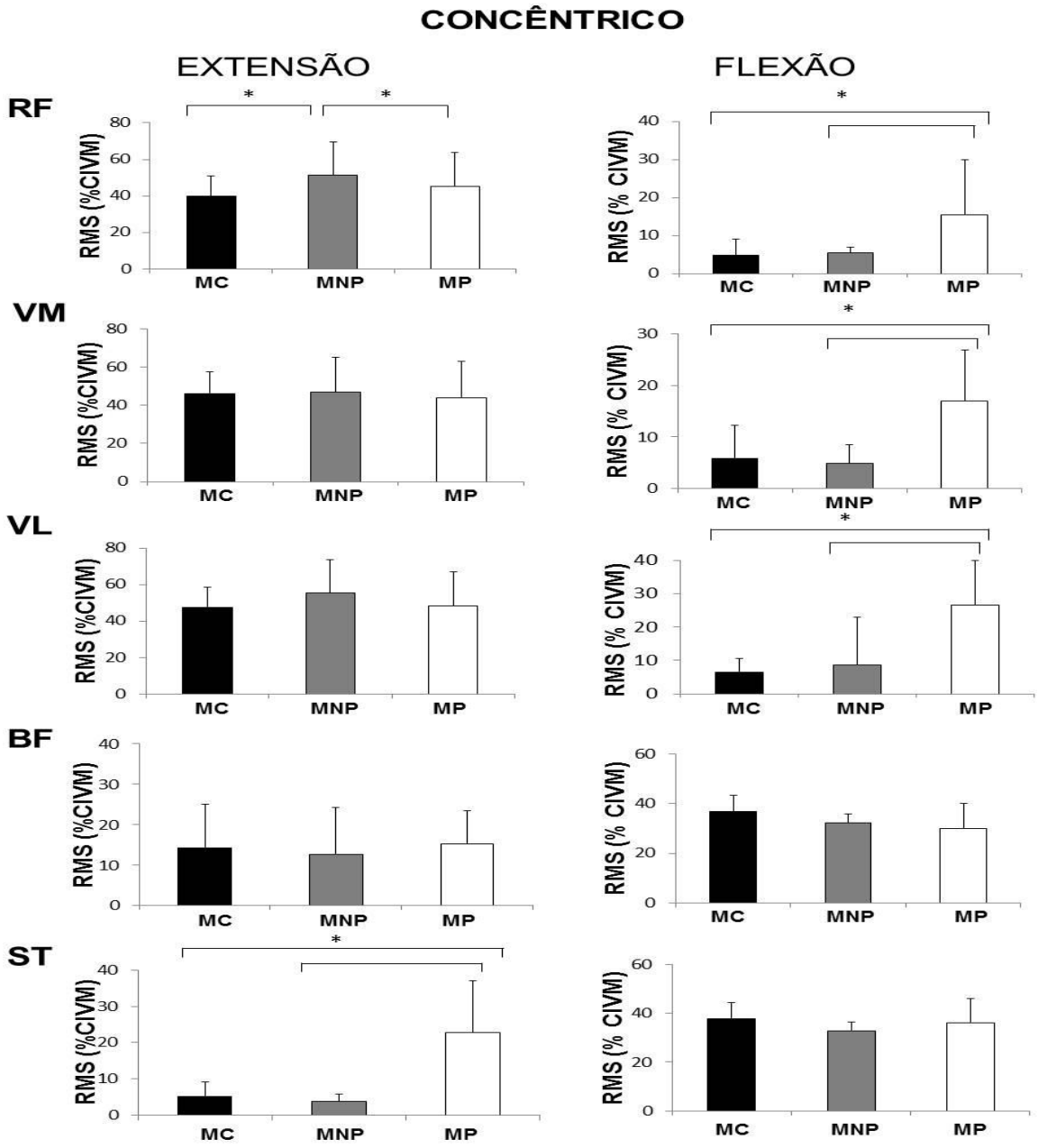


Figura 4. ***Ativação muscular durante as contrações dinâmicas concêntricas dos extensores e flexores do joelho.*** RMS: Root Mean Square; CIVM: Contra-«o Isom®trica Volunt§ria M§xima; MC: membro controle; MNP: membro n«o par®tico; MP: membro par®tico; RF: reto femoral; VM: vasto medial; VL: vasto lateral; BF: b²ceps femoral; ST: semitendinoso. *p<0,05. Compara-»es apresentadas pelos colchetes. Note o aumento da atividade do RF e do ST no membro par®tico durante a flex«o e a extens«o conc°ntricas, respectivamente.

Figura 5

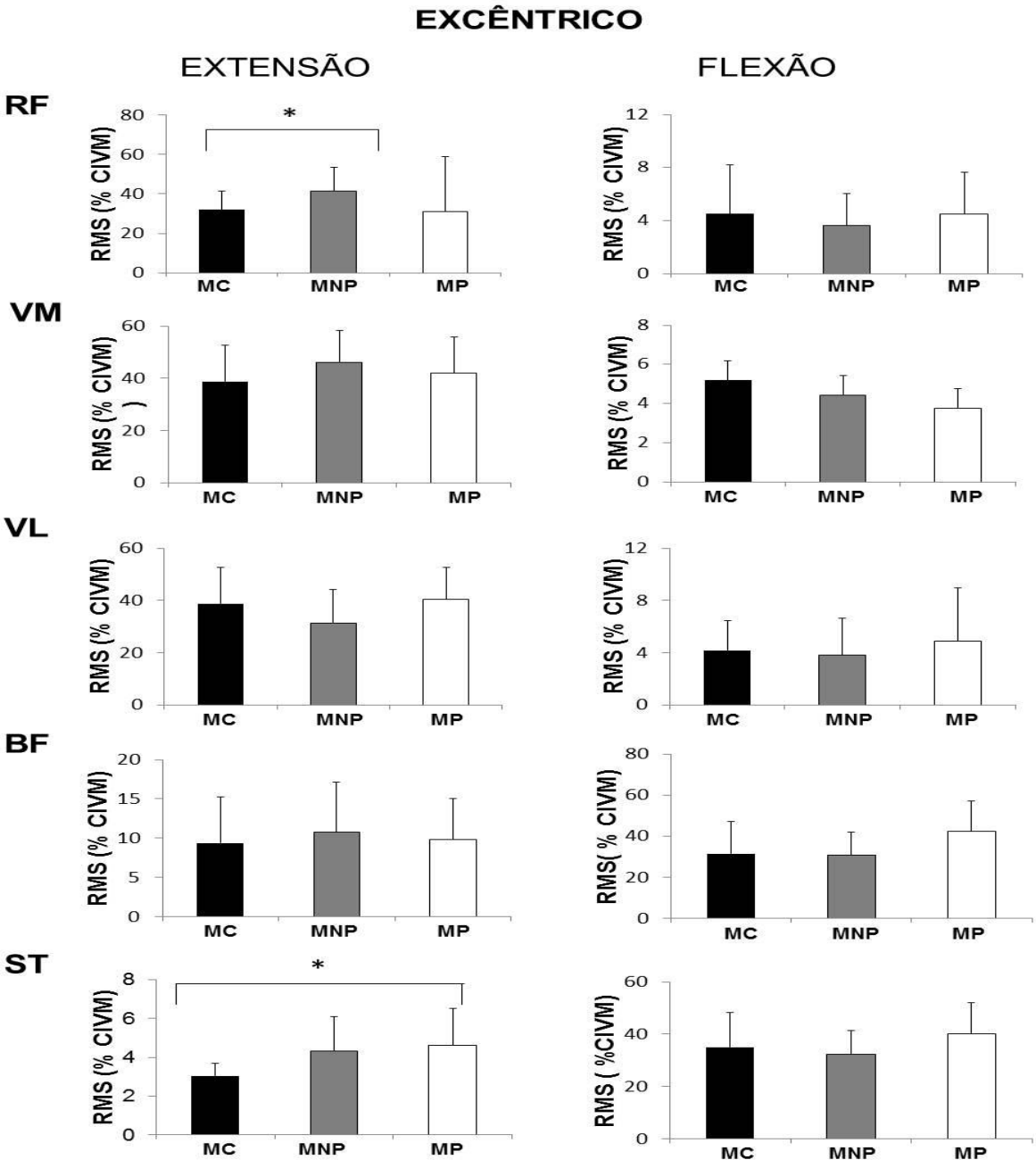


Figura 5. ***Ativação muscular durante as contrações dinâmicas excêntricas dos flexores e extensores de joelho.*** RMS: Root Mean Square; CIVM: Contra-«o Isom®rica Voluntˆria M§xima; MC: membro controle; MNP: membro n«o par®tico; MP: membro par®tico; RF: reto femoral; VM: vasto medial; VL: vasto lateral; BF: b²ceps femoral; ST: semitendinoso. *p<0,05. Compara-»es apresentadas pelos colchetes. Observe o aumento da atividade do RF do MNP e do ST do MP durante a extens«o do joelho. Durante a flex«o, n«o houve diferen-as significativas entre os grupos.

Correlações entre as concentrações séricas de IGF-I e IGFBP-3 e variáveis do desempenho neuromuscular e funcionalidade

Houve correla-«o moderada entre as concentra-»es s®ricas de IGF-I e o d®ficit do PT extensor conc°ntrico do membro n«o par®tico (R= -0,6; p = 0,04). A redu-«o da concentra-«o s®rica de IGFBP-3 apresentou correla-«o com o d®ficit na velocidade da marcha (R= 0,6, p= 0,042). A concentra-«o s®rica de IGFBP-3 apresentou correla-«o com o PT (R = 0,6; p = 0,04), trabalho (R = 0,6; p = 0,05) e pot°ncia (R = 0,6; p = 0,05) do membro n«o par®tico durante a flex«o conc°ntrica. O teste de 10 m (m/s) apresentou forte correla-«o com o trabalho (R = 0,70; p = 0,014) e a pot°ncia (R = 0,6; p = 0,043) durante a flex«o conc°ntrica do membro par®tico. O d®ficit de equil²brio apresenta correla-«o inversamente proporcional ¨ ativa-«o do m¼sculo RF durante a extens«o exc°ntrica do membro n«o par®tico (R= -0,88 p=0,001).

DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou informa-»es relevantes para o entendimento dos mecanismos de fraqueza muscular em indiv²duos com hemiparesia cr¹nica p· s-AVC. Al®m disso, abre perspectivas para o delineamento de programas de reabilita-«o para esta popula-«o. Dentre os avan-os e novidades apresentados destaca-se a quantifica-«o de biomarcadores para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas adapta-»es neuromusculares p· s-AVC. A combina-«o de ferramentas de investiga-«o complementares, focando componentes musculares, neurais e moleculares relacionados com a for-a em um ¼nico estudo, assim como a utiliza-«o de ferramentas para avalia-«o dos componentes neurais da for-a durante contra-»es din©micas.

Identificar modifica-»es nos componentes de gera-«o da for-a permite tra-ar estrat®gias terap°uticas efetivas e seguras no programa de reabilita-«o p· s-AVC. Neste sentido, o presente estudo demonstrou de forma in®dita que a fraqueza ® decorrente de modifica-»es neurais e musculares e que adapta-»es moleculares do eixo Horm¹nio de Crescimento/IGF-I podem contribuir para o entendimento destes mecanismos de perda de for-a p· s-AVC, atendendo a hip· tese inicial deste trabalho. Assim, o desempenho neuromuscular observado nos testes isocin®ticos pode ser explicado em parte pela diminui-«o das concentra-»es s®ricas de IGF-I e IGFBP-3, por uma atrofia seletiva dos m¼sculos quadr²ceps e dos isquiotibiais, e tamb®m por altera-»es na ativa-«o de m¼sculos agonistas e antagonistas durante os testes isocin®ticos, principalmente no modo conc°ntrico.

Resultados referentes ao PT, trabalho e pot°ncia dos flexores e extensores do membro par®tico evidenciam um desempenho neuromuscular diminu²do em rela-«o ao membro n«o par®tico e ao Grupo Controle. Estes achados corroboram em parte com outros do nosso grupo de pesquisa (PRADO-MEDEIROS *et al*., 2012). Este estudo pr®vio tamb®m detectou uma

redu-«o das vari§veis PT e pot°ncia de extensores e flexores do joelho nos membros par®icos em rela-«o ao controle. Contudo, estes autores tamb®m relatam uma diminui-«o destas vari§veis nos membro n«o par®ico, discordando dos presentes achados. Diferen-as das popula-»es investigadas podem explicar tais disparidades, pois Prado-Medeiros *et al.* (2012) descreveram uma popula-«o com maior n²vel de espasticidade e incapacidade que os do presente estudo. Al®m disso, houve diferen-as metodol· gicas na aquisi-«o da imagem por Resson©ncia Nuclear Magn®tica. Neste estudo pr®vio, n«o foram mensurados a extens«o total dos m¼sculos (limita-«o do equipamento) e o volume de cada m¼sculo, e sim, o volume muscular total.

Em rela-«o ¨ atrofia muscular, estudos que avaliaram o trofismo muscular, seja por biopsia, §rea de sec-«o transversa ou volume muscular, t°m apresentado diferen-as entre seus resultados. Por exemplo, existem estudos que n«o observaram atrofia no membro par®ico (SUNNERHAGEN *et al.,* 1999), enquanto em outros foram apresentadas diferen-as significativas entre lados par®ico e n«o par®ico (METOKI *et al.*, 2003; RYAN *et al.*, 2002). Al®m disso, recentes estudos que mensuraram o volume muscular do membro inferior por Resson©ncia Magn®tica Nuclear em indiv²duos p· s-AVC tamb®m detectaram uma importante atrofia de quadr²ceps (PRADO-MEDEIROS *et al,* 2012; RAMSAY *et al.,* 2011) e isquiotibiais par®icos (RAMSAY *et al.,* 2011) mas apenas quando comparado com os respectivos m¼sculos n«o par®icos. Assim, refor-a-se a necessidade de descri-«o detalhada das popula-»es investigadas para fins comparativos entre os estudos. Provavelmente a controv®rsia entre os resultados ®consequ°ncia da diferente resposta de cada m¼sculo frente ao n²vel de atividade f²sica do indiv²duo, avalia-»es em diferentes fases p· s-AVC, demanda imposta a cada m¼sculo e variabilidade de caracter²sticas cl²nicas (PRADO-MEDEIROS *et al.*, 2012; LIEBER *et al.*, 2004).

Complementarmente aos resultados relacionados ¨ estrutura muscular, o presente estudo tamb®m demonstrou um padr«o de recrutamento muscular alterado. Detectou-se a manuten-«o da atividade de m¼sculos agonistas do movimento, mas tamb®m o aumento da atividade antagonista como visto claramente na flex«o conc°ntrica do joelho. De forma interessante, os m¼sculos RF e VL mostraram altera-»es nos seus padr»es de ativa-«o neural, embora n«o tenham apresentado atrofia. Os autores atribuem estas diferen-as entre a-»es conc°ntricas e exc°ntricas isocin®ticas ¨ especificidade da atividade. Juntos, estes resultados demonstram estrat®gias diversas de ativa-«o muscular durante atividades distintas. Estes resultados s«o um tanto discrepantes daqueles j§ descritos pela literatura.

Em conta partida, estudos pr®vios (PATTEN *et al*., 2004; GOWLAND *et al.*, 1992; KNUTSSON *et al*., 1997) relataram uma diminui-«o da ativa-«o agonista. Existem teorias que descrevem o aumento da atividade da musculatura antagonista como em decorr°ncia do reflexo de estiramento destes m¼sculos, hipotetizam a chamada ñrestri-«o antagonistaò em que o aumento da atividade antagonista aumenta a inibi-«o rec²proca do grupamento agonista (KNUTSSON *et al*., 1997; PATTEN *et al.*, 2004). Contudo, varia-»es metodol· gicas entre os estudos, como por exemplo, na escolha dos m¼sculos e atividades testadas, tornam o tema ainda bastante controverso.

Al®m disso, altera-»es na ativa-«o muscular foram tamb®m observadas no membro n«o par®tico, como por exemplo, o aumento da ativa-«o do m¼sculo RF durante a extens«o conc°ntrica e exc°ntrica do joelho. Os achados no membro n«o par®tico refor-am relatos da literatura que este membro tamb®m apresenta altera-»es decorrentes do AVC (PRADO-MEDEIROS *et al*., 2012). Contudo, devido ¨ manuten-«o do desempenho neuromuscular e do volume muscular ®poss²vel interpretar estas modifica-»es como estrat®gias neurais para a funcionalidade do membro n«o par®tico.

Al®m disso, concentra-»es s®ricas menores de IGF-I e IGFBP-3 em indiv²duos hemipar®ticos foram observadas contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos moleculares de adapta-«o neuromuscular p· s-AVC. Um aspecto importante a ser destacado ® que pela primeira vez foi demonstrado que indiv²duos hemipar®ticos cr¹nicos apresentam menores concentra-»es s®ricas de IGF-I e IGFBP-3 e que as concentra-»es s®ricas de IGFBP-3 s«o correlacion§veis com d®ficits na velocidade da marcha. Estes resultados indicam perspectivas importantes, pois um teste cl²nico validado e facilmente reproduz²vel, como o teste de caminhada de 10 m, poderia inferir informa-»es sobre os n²veis de um biomarcador relacionados aos trofismos muscular (SUETTA et al., 2010; CLEMMONS, 2009; GLASS, 2005) e neuronal (KOOIJMAN *et al.* 2009, CLEMMONS, 2009, CARRO *et al*., 2005). Estudos futuros deveriam tamb®m considerar indiv²duos com incapacidade mais severa e diferentes per²odos p· s-AVC a fim de verificar esta correla-«o. Indiv²duos hemipar®ticos cr¹nicos com diferentes n²veis de incapacidade e fases p· s-AVC deveriam ser investigados. Assim, testes preditivos do progn· stico da recupera-«o motora e funcional poderiam ser desenvolvidos. Ainda, em rela-«o a uma maior aplicabilidade cl²nica, estas correla-»es deveriam ser verificadas em rela-«o aos testes de for-a manual.

Recentemente, Smedt e colaboradores (2011) mostraram que altos n²veis de IGF-I ou IGF-I/IGFBP-3, 6 horas ap· s um AVC, estavam relacionados a uma recupera-«o neurol· gica e a uma melhora da fun-«o, 3 meses ap· s a les«o. Uma poss²vel explica-«o para esta correla-«o envolve a a-«o anti-apopt· tica de IGF-I, tendo uma a-«o neuroprotetora quando hiperexpresso logo ap· s a les«o. Associando estas informa-»es ®poss²vel hipotetizar que o uso de f§rmacos ou recursos f²sicos, como o fortalecimento, que ajam sobre a via IGF-I, possa apresentar efeitos sobre a recupera-«o funcional de hemipar®ticos cr¹nicos.

Outro recente estudo mostrou que indiv²duos que apresentaram hemorragia subaracn· ide por aneurisma tamb®m possu²am n²veis reduzidos de IGF-I de 1 a 5 dias p· s-les«o. Estes n²veis eram normalizados ap· s 3 meses de les«o. Os autores atribu²ram menores concentra-»es s®ricas de IGF-I a uma insufici°ncia na produ-«o de horm¹ nio de crescimento pela gl©ndula pituit§ria e possivelmente a uma diminui-«o de IGF-I pelo f²gado. As concentra-»es de IGF-I foram correlacion§veis com a qualidade de vida dos indiv²duos, mas n«o ¨ gravidade da les«o (BENDEL *et al.*, 2010). Vale destacar que o presente estudo encontrou concentra-»es s®ricas reduzidas de IGF-I mesmo em indiv²duos cr¹ nicos. Possivelmente, o n²vel de atividade dos indiv²duos e programas de reabilita-«o empregados sejam vari§veis que afetam estas concentra-»es.

Correla-»es interessantes foram observadas no presente estudo, por exemplo, concentra-»es s®ricas de IGF-I foram correlacionadas ao d®ficit do PT extensor conc°ntrico do membro n«o par®tico. Tamb®m foi encontrada uma correla-«o entre as concentra-»es s®ricas de IGFBP-3 e PT, pot°ncia e trabalho durante a flex«o conc°ntrica do membro n«o par®tico. Estudos futuros deveriam considerar testes de for-a manual dos m¼sculos extensores e flexores do joelho para verificar poss²veis correla-»es com estes biomarcadores.

Indiv²duos hemipar®ticos cr¹ nicos geralmente apresentam modifica-»es nas vari§veis biomec©nicas da marcha. Dentre as altera-»es da marcha de indiv²duos hemipar®ticos cr¹ nicos h§ menor velocidade e de cad°ncia e o prolongamento da fase de balan-o (Nasciutti-Prudente *et al.*, 2009; Richards e Olney, 1996). Considerando estas altera-»es, as correla-»es entre a diminui-«o da velocidade da marcha, do trabalho e da pot°ncia dos flexores do joelho durante contra-»es conc°ntricas do membro par®tico que tamb®m foram detectadas s«o relevantes. Assim, podemos sugerir que a °nfase no treino conc°ntrico dos m¼sculos flexores do joelho seria capaz de aumentar a velocidade da marcha desses pacientes, promovendo

assim a facilita-«o durante a flex«o do joelho do membro par®tico e consequentemente um menor tempo durante a fase de balan-o no ciclo da marcha. Estes resultados tamb®m mostram que o membro n«o par®tico deve ser alvo do programa de reabilita-«o, visto que apresenta altera-»es na ativa-«o muscular. Estudos na literatura tamb®m observaram correla-»es entre concentra-»es s®ricas de IGF-I com desempenho muscular e fun-«o. Jurimae *e* colaboradores (2010) correlacionou as concentra-»es s®ricas de IGFBP-3 com o PT durante a extens«o isom®trica de mulheres saud§veis. Onder e colaboradores (2006) encontrou uma rela-«o entre Concentra-»es S®ricas IGF-I e testes de caminhada e for-a manual na popula-«o de idosos.

O presente trabalho possui algumas limita-»es que devem ser consideradas. As avalia-»es ocorreram predominantemente durante o per²odo vespertino (14 e 17 horas), portanto n«o houve controle rigoroso do ciclo circadiano. A import©ncia deste controle consiste na diferen-a entre concentra-»es s®ricas de IGF-I e IGFBP-3 em diferentes per²odos do dia. Entretanto, a vari§vel relacionada apresentou homogeneidade. Diferentes tipos de AVC hemorr§gico e isqu°mico foram inclu²dos no estudo, por®m houve uma distribui-«o equilibrada destes tipos. Al®m da amostra pareada, tivemos o cuidado de controlar o n²vel funcional dos participantes.

CONCLUSÃO

Indiv²duos hemipar®icos cr¹nicos apresentam fraqueza muscular no membro par®tico decorrente de altera-»es no desempenho neuromuscular, incluindo diminui-«o do PT, pot°ncia e trabalho, e tamb®m devido a altera-»es no recrutamento entre m¼sculos agonistas e antagonistas do movimento. Este trabalho demonstra pela primeira vez que estas modifica-»es neurais s«o acompanhadas por atrofia seletiva de m¼sculos do quadr²ceps e dos isquiotibiais e por diminui-«o nas concentra-»es s®ricas de IGF-I e IGFBP-3, culminando em d®ficits funcionais.

AGRADECIMENTOS:

Os pesquisadores agradecem a Teresa F. Piassi por servi-os t®cnicos prestados para a coleta de sangue dos sujeitos e a equipe do CIDI S«o Carlos pelo apoio na realiza-«o das Resson©ncia Magn®tica Nuclear. Este projeto recebeu apoio financeiro da Funda-«o de Amparo ¨ Pesquisa do Estado de S«o Paulo (FAPESP, n¼mero do processo: 2011/02703-3) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq, n¼mero do processo: 470892/2011-0), M. A. Silva-Couto e C. C. Alcantara s«o bolsistas de mestrado e C. L. Prado-Medeiros de p· s-doutorado do CNPq.

ATIVIDADES NO PERÍODO

Durante o per²odo do mestrado, al®m do trabalho apresentado, tamb®m estive envolvida em outros estudos vinculados a esta linha de pesquisa.

Projetos de pesquisa

Atualmente, participo da equipe de trabalho que atua em dois projetos em andamento. Ambos t°m como objeto de pesquisa indiv²duos com hemiparesia cr¹nica. O projeto intitulado de ñ*Efeitos do fortalecimento excêntrico no volume muscular e no desempenho de flexores e extensores do joelho de hemiparéticos crônicos"* desenvolvido pela pesquisadora p·s- doutoranda Christiane L. Prado-Medeiros e o projeto desenvolvido pela Mestranda Carolina C. Alc©ntara, intitulado ñ*Efeitos do treinamento de fortalecimento sobre a adaptação neuromuscular em indivíduos hemiparéticos crônicos: uma perspectiva sobre biomarcadores moleculares*ò s«o desenvolvidos em parceria entre o Laborat·rio de Plasticidade Muscular e o Laborat·rio de Pesquisa em Fisioterapia Neurol·gica (LaFiN).

Durante este per²odo foram publicados dois manuscritos, um como primeira autora e outro como coautora. Estes manuscritos referem-se a trabalhos pr®vios desenvolvidos no Laborat·rio de Plasticidade Muscular, durante o per²odo em que fui bolsista de apoio t®cnico (bolsa FAPESP TT3). Os manuscritos est«o em anexo.

Por ordem cronol·gica, tive o seguinte trabalho publicado no ***American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*** (ñ*Joint Inflammation Alters Gene and Protein Expression and Leads to Atrophy in the Tibialis Anterior Muscle in Rats*ò. Ramirez C, Russo

TL, Sandoval MC, Dentillo AA, Couto MAS, Durigan JLQ, Salvini TF, 2011). Esta revista ® considerada como Qualis A1 na §rea de educa-«o f²sica da CAPES.

O segundo manuscrito foi publicado na Revista Brasileira de Fisioterapia em 2012 e foi intitulado ñ*Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation*ò, autores: Silva-Couto MA, Gigo-Benato D., Tim CR, Parizotto NA, Salvini TF, Russo TL. A Revista Brasileira de Fisioterapia ®avaliada como Qualis A2 na §rea de educa-«o f²sica da CAPES. Destaca-se o fato de que estes dois trabalhos foram produzidos a partir de experi°ncia na §rea de pesquisa b§sica.

Durante a realiza-«o do trabalho de conclus«o em Especializa-«o em Fisioterapia Geri§trica foi desenvolvido o terceiro manuscrito, aceito para publica-«o em 2012. SILVA-COUTO, M. A. S.; REIFF, R.; CASTRO, A. P. ñ*Funcionalidade após a cirurgia de quadril: Correlação entre equilíbrio, Idade, independência e depressão em idosos*ò. Acta Fisi§trica (aceito para publica-«o). Com a continua-«o deste trabalho, tive a oportunidade de orientar o aluno Diego Henrique P§dua Pedro (ñFuncionalidade, dor e qualidade de vida de idosos portadores de osteoartrite ap· s artroplastia total de quadril. 2012) em seu trabalho de conclus«o da Especializa-«o em Especializa-«o em Fisioterapia Geri§trica.

A participa-«o do grupo de pesquisa no 8ÜWorld Stroke Congress - Brasilia 2012) Congresso Internacional de AVC ñStrokeò resultou em dois trabalhos apresentados em formato de p¹ ster ñ*Correlations between isokinetics performance of knee extensors and flexors muscles with functionality in chronic hemiparetic subjects*ò (SILVA-COUTO, M. A., ALCANTARA, C. C. ; PRADO-MEDEIROS, C. L. ; REZENDE, M. A. ; TAKAHASHI, C. ; GUIMARAES, A. ; MATTIOLI, Rosana ; Salvini, Tania F. ; RUSSO, T. L.) e "*Evaluation of tonus, density of connective tissue and passive torque peak of extensors and flexors of knee in*

*chronic hemiparetics". (*ALCANTARA, C. C.; SILVA-COUTO, M. A.; TAKAHASHI, C. ; MAEDA, C. ; PRADO-MEDEIROS, C. L. ; Salvini, Tania F. ; RUSSO, T. L.)

Atividades didáticas

Durante o mestrado desenvolvi atividade de co-orienta-«o de Trabalho de Conclus«o de Curso gradua-«o em Fisioterapia. As alunas orientadas foram: Monica Ambiel Rezende, sendo o trabalho intitulado ñ*Correlação entre o desempenho isocinético dos músculos extensores do joelho e a funcionalidade em indivíduos hemiparéticos crônicos*ò e a aluna de inicia-«o cient²fica Araci Teixeira Guimar«es. O t²tulo do trabalho ®ñ*Avaliação do volume muscular e da funcionalidade em hemiparéticos crônicos*ò.

Por fim, sou colaboradora do projeto de extens«o PROEXT 2013, intitulado ñ*Cuidado aos usuários com afecções neurológicas no município de São Carlos: uma perspectiva de linha de cuidado vinculada ao SUS*ò, e aprovado em 2012. Todas as atividades foram desenvolvidas por interm®dio da Universidade Federal de S«o Carlos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMO M, FARRAR RP. Resistance training, and IGF involvement in the maintenance of muscle mass during the aging process. **Ageing Res**. 2006;310ï 331.

BAECKE JA, BUREMA J, FRIJTERS JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. **Am J Clin Nutr** 1982; 36:936-42.

BAYS CL. Quality of life of stroke survivors: a research synthesis. **J Neurosci N.** 2001;33(6):310-6.

BENDEL S, KOIVISTO K, RYYNANEN O, RUOKONEN E, ROMPPANEN J, KIVINIEMI V, UUSARO A. Insulin like growth factor-I in acute subarachnoid hemorrhage: a prospective cohort study **Critical Care.** 2010, 14:R75.

BENHADDAD A, BOUIX D, KHALED S. Early hemorheologic aspects of overtraining in elite athletes. **Clin Hemorheol Microcirc**.1999;20:117ï 25.

BERG K, WOOD-DAUPHINEE S, WILLIAMS JI. The balance scale: reliability assessment with elderly residents and patients with acute stroke. **Scand J Rehabil Med.** 1995;27:27ï 36.

BERG U, GUSTAFSSON T, SUNDBERG CJ, KAIJSER L, CARLSSON-SKWIRUT, BANG P. Interstitial IGF-I in exercising skeletal muscle in women. **Eur J Endocrinol**. 2007;157(4):427-35.

BERG U, GUSTAFSSON T,SUNDBERG CJ, KAIJSER L, CARLSSON-SKWIRUT , BANG P. European Interstitial IGF-I in exercising skeletal muscle in women. **J Endocr.** 2007; 157: 427ï 435.

Billinger SA., Guo LX., Pohl Patricia S., Kluding PM. Single Limb Exercise: Pilot Study of Physiological and Functional Responses to Forced Use of the Hemiparetic Lower Extremity. **Top Stroke Rehabil**. 2010;17(2):128ï 139

BLUM L, NICOL KORNER-BITENSKY Usefulness of the Berg Balance Scale in Stroke Rehabilitation: A Systematic Review. **Phys Ther**. 2008; 88:559-566.

BOHANNON RW, SMITH MB. Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. **Phys Ther**. 1987; 67:206-7.

BONDANELLI M, AMBROSIO MR, ONOFRI A, BERGONZONI A, LAVEZZI S, ZATELLI MC, BASAGLIA DVN, Ettore C. Predictive Value of Circulating Insulin-Like Growth Factor I Levels in Ischemic Stroke Outcome. **J Clin Endocrinol Metab**. 2006;91: 3928ï 3934.

BRUCKI S, NITRINI R, CARAMELLI P, BERTOLUCCI PHF, OKAMOTO IH. Sugest»es para o uso do Mini-exame do estado mental no Brasil. **Arq Neuropsiquiatr.** 2003; 61(3-B):777-781.

CAPPOLA A, BANDEEN-ROCHE K,WAND GS, VOLPATO S, FRIEDF. Association of IGF-I Levels with Muscle Strength and Mobility in Older Women. **J Clin. Endocrinol. Metab**. 2001.

CARIN-LEVY G, GREIG C, YOUNG A, LEWI S, HANNAN J, MEAD G. Longitudinal changes in muscle strength and mass after acute stroke. **Cerebrovasc. Dis**. 2006;21:201-207.

CARRO E, SPUCH C, TREJO JL, ANTEQUERA D, TORRES-ALEMAN I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by s®um insulin-like growth factor I. **J Neurosci,** 25(47):10884-10893, 2005.

CHRISTENSEN B, DYRBERG E, AAGAARD P, KJAER M, LANGBERG H. Short-term immobilization and recovery affect skeletal muscle but not collagen tissue turnover in humans. **J Appl Physiol.** 2008;105:1845-1851.

CLEMMONS, D.R. Role of IGF-1 in skeletal muscle mass maintenance. **Trends Endocrin Metabol.** 2009; (20)7, 349-356.

COPELAND JL, CONSITT LA, Tremblay MS. Hormonal responses to endurance and resistance exercise in females aged 19-69 years. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2002;57(4):B158-65.

DALL R, LANGE KHW, KJAER M, JORGENSEN JOL, CHRISTIANSEN JS, ORSKOV H, FLYVBJERG A. No Evidence of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 3 Proteolysis during a Maximal Exercise Test in Elite Athletes. **J Clin Endocrinol Metab** 86: 669ï 674, 2001.

DENLEY A., Cosgrove L., Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. **Cytok Growth Fact Rev.** 2005 (16) 421ï 439.

DOUGLAS JB, SILVERMAN DT, POLLAK MN, TAO Y, SOLIMAN AS, STOLZENBERG-SOLOMON RZ. Serum IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, and IGF-I/IGFBP-3 Molar Ratio and Risk of Pancreatic Cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial Cancer. **Epidemiol Biomarkers Prev.** 2010;19:2298-2306.

DUNCAN P; RICHARDS L, WALLACE D, STOKER-YATES J, POHL P; LUCHIES C, OGLE A; STUDENSKI S. A Randomized, Controlled Pilot Study of a Home-Based Exercise Program for Individuals With Mild and Moderate Stroke. **Stroke**. 1998; 29:2055-2060.

DUNCAN PW, WEINER DK, CHANDLER J, STUDENSKI S. Funcitonal reach: a new clinical measure of balance. **J Gerontol**. 1990;45 (6):M192-7

ELLOUMI M, ELJ NE, ZAOUALI M, FILAIRE, TABKA Z, LAC G. IGFBP-3, a sensitive marker of physical training and overtraining. Br J Sports Med 2005;39:604ï 610.

ENGARDT M, KNUTSSON E, JONSSON M, STERNHAG M. Dynamic muscle strength training in stroke patients: effects on knee extension torque, electromyographic activity, and motor function. **Arch Phys Med Rehabil**. 1995; 76:419-25.

ENZINGER C, MD; Johansen-Berg H, Dawes H, Bogdanovic M, Collett J, Guy C; Wade D, Fazekas F, Matthews P. Functional MRI Correlates of Lower Limb Function in Stroke Victims With Gait Impairment. **Stroke**. 2008; 39: 1507-1513.

ENZINGER C, MD; JOHANSEN-BERG H, DAWES H, BOGDANOVIC M, COLLETT J, GUY C; WADE D, FAZEKAS F, MATTHEWS P. Functional MRI Correlates of Lower Limb Function in Stroke Victims With Gait Impairment. **Stroke.** 2008; 39:1507-1513.

FARIA CDCM, TEIXEIRA-SALMELA LF, NADEAU S. Effects of the Direction of Turning on the Timed Up & Go Test with Stroke Subjects. **Top Stroke Rehabil** 2009;16(3):196ī 206.

FEIGIN VL, LAWES CMM, BERNNETT DA, ANDERSON CS. Stroke epidemiology: a review of population-basedstudies of incidence, prevalence, and case-fatality the late 20th century. Lancet Neurol. 2003; 2.:43-53.

FLECKENSTEIN JL, CRUES JV, REIMERS CD. **Muscle imaging in heath and disease.** MRI of the lower extremity. Springer, Berlin Heidelberg. New York, 1a Ed., 1996; 89 ï 99.

FLORINDO AA, LATORRE MRDO, JAIME PC, TANAKA T, ZERBINI CA. Metodologia para avalia-«o da atividade f²sica habitual em homens com 50 anos ou mais. **Rev Saúde Pública** 2004, 38:307-14.

FOLSTEIN MF, FOLSTEIN SE, MCHUGH PR."Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **J Psychiatr Re**s. 1975;12(3):189-198.

FUGL-MEYER AR, JAASKO L, LEYMAN I, OLSSON S, STEGLIND S. The poststroke hemiplegic patient: method for evaluation of physical performance. **Scand J Rehabil Med**. 1975;7:13ï 31.

GAI J, GOMES L, Nč BREGA OT, RODRIGUES MP. Fatores associados a quedas em mulheres idosas residentes na comunidade. **Rev Assoc Med Bras.** 2010;56 (3):327-332

GIBNEY J, HEALY ML, S¥ NKSEN PH.The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in exercise and sport. **Endocr Rev.** 2007;28(6):603-24. Review.

GILES MF, Rothwell PM. Measuring the prevalence of stroke. **Neuroepidem**. 2008; 30:205-6.

GIOVANNINI S, MARZETTI E, BORST S, LEEUWENBURGH C. Modulation of GH/IGF-1 axis: Potential strategies to counteract sarcopenia in older adults. **Mech Ageing Dev**. 2008; 129(10): 593-601.

GLASS DJ. PI3 Kinase Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy.**Curr Top Microbiol Immunol.** 2011; 346:267-78.

GLASS DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. The International **J Bioch Cell Biol**. 2005; 37: 1974ï 1984.

GOLDSPINK G. Loss of muscle strength during aging studied at the gene level. Review. **Rejuvenation Res.** 2007;10(3):397-405.

GOWLAND C, BRUIN H, BASMAJIAN JV, PLEWS N, BURCEA I. Agonist and antagonista activity during voluntary upper-limp movement inpatients with stroke. **Physical Therapy**. 1992;72:624-633.

HACHISUKA K, UMEZU Y, OGATA H. Disuse muscle atrophy of lower limbs in hemiplegic patients. **Arch Phys Med Rehabil**. 1997, vol. 78, no1, pp. 13-18.

HAFER-MACKO CE, RYAN AS, IVEY F, MACKO RF. Skeletal muscle changes after hemiparetic stroke and potential beneficial effects of exercise intervention strategies. **J Rehab Res Dev.** 2008;45, (2): 261ï 272.

HANKINSON , S.E.; WILLETT, W.C.; COLDITZ. G.A.; HUNTER, D.J.; MICHAUD, D.S.; DEROO, B.; ROSNER, B.; SPEIZER, F.E.; POLLAK, M.. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. **Lancet.** 1998;351:1393-1396.

HERMENS HJ, FRERIKS B, MERLETTI R. SENIAM 8: European recommendations for surface electromyography. **Roes Res Dev**, 1999.

HORSTMAN A, GERRITS K, BELTMAN M, JANSSEN T, KONIJNENBELT M, HAAN A. Muscle function of knee extensors and flexors after stroke selectively impaired at shorter muscle lengths. **J Rehabil Med**. 2009; 41: 317ï 321

HORSTMAN A, BELTMAN M, GERRITS KH, KOPPE P, JANSSEN TW, ELICH P, HAAN A. Intrinsic muscle strength and voluntary activation of both lower limbs and functional performance after stroke. **Clin Physiol Funct Imag**. 2008; 28, 251ï 261.

HSUEH IP, LEE MM, AND HSIEH CL. Psychometric characteristics of Barthel activities of dayly living in stroke patients. **J Formos Med Assoc**. 2001(8); 100.

JASSAL S, MUHLEN D, BARRETT-CONNOR E, ROSEN CJ. Serum insulin-like growth factor binding protein-1 levels and bone mineral density in older adults: The Rancho Bernardo Study. **Osteoporos Int**. 2005; 16: 1948ï 1954.

JOGIE-BRAHIM S, FELDMAN D, OH Y.Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. Review. **Endocr Rev.** 2009;30(5):417-37.

JONSDOTTIR J, CATTANEO D. Reliability and validity of the Dynamic Gait Index in persons with chronic stroke. **Arch Phys Med Rehabil**. 2007;88:1410-5.

JORGENSEN L, JACOBSEN BK.Changes in muscle mass, fat mass, and bone mineral content in the legs after stroke: a 1 year prospective study. **Bone**. 2001 Jun;28(6):655-9.

JURIMAE J, JURIMAE T. Plasma adiponectin concentration in healthy preand postmenopausal women: relationship with body composition, bone mineral and metabolic variables. Am J **Physiol Endocrinol Metab**, 2007; 293: E42ï E47.

JURIMAE T, SUKE P, KUMS T, GAPEYEVA H, ERELINE J, SAAR M, JURIMA J. Relationships between contraction properties of knee extensor muscles and fasting IGF-1 and adipocytokines in physically active postmenopausal women. **Clin Physiol Funct Imaging**, 2010; 30, 344ï 348.

JUUL A, DALGAARD P, BLUM WF, et al. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80(8):2534ï 42.

KAAKS R. Plasma insulin, IGF-I and breast cancer. **Gynecol Obstet Fertil**. 2001;29(3):185-91.

KOOIJMAN, SARRE S, MICHOTTE Y, KEYSER J. Insulin-Like Growth Factor I A Potential Neuroprotective Compound for the Treatment of Acute Ischemic Stroke? **Stroke**. 2009;40:e83-e88.

LIEBER RL E WARD SR. SKELETAL MUSCLE DESIGN TO MEET FUNCTIONAL DEMANDS. **Phil. Trans. R. Soc. B**. 2011 366, 1466ï 1476.

LIEBER RL, STEINMAN S, BARASH IA, CHAMBERS H. Structural and functional changes in spastic skeletal muscle. **Muscle Nerve**. 2004 ;29(5):615-27

LIMA RCM, TEIXEIRA-SALMELA LF, MAGALHë ES LC, GOMES-NETO M. Propriedades psicom®tricas da vers«o brasileira da escala de qualidade de vida espec²fica para

acidente vascular encef§lico: aplica-«o do modelo Rasch. Rev Bras Fisioter. 2008;12(2):149-56.

MAHONEY FI, BARTHEL DW. Functional evaluation: the Barthel Index. Md State Med J. 1965;41:61ï 65.

MAKI T, QUAGLIATO EMAB, CACHO EWA , PAZ LPS, NASCIMENTO NH, INOUE MMEA,VIANA MA. Estudo De Confiabilidade Da Aplica-«o Da Escala De Fugl-Meyer No Brasil. **Rer Bras Fisiot**. 2006;10 (2) 177-183.

MATHENY W, MERRITT E. ZANNIKOS SV, FARRAR RP, ADAMO ML. Serum IGF-I-Deficiency Does Not Prevent Compensatory Skeletal Muscle Hypertrophy in Resistance Exercise. **Exp Biol Med**. 2009;234:164ï 170.

MATTSSON A, SVENSSON D, SCHUETT B, OSTERZIEL KJ, RANKE MB. Multidimensional reference regions for IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 concentrations in serum of healthy adults. **Growth Horm IGF Res**. 2008 ;18(6):506-16.

McKENZIE MJ, Yu S. , PRIOR SJ, MACKO R, HAFER-MACKO C. Hemiparetic Stroke Alters Vastus Lateralis Myosin Heavy Chain Profiles Between the Paretic and Nonparetic **Muscles Res Sports Med**. 2009; 17(1): 17ï 27.

McKENZIE MJ, YU, PRIOR SJ, MACKO RF,HAFER-MACKO CE. Hemiparetic Stroke Alters Vastus Lateralis Myosin Heavy Chain Profiles Between the Paretic and Nonparetic Muscles. **Res Sports Med**. 2009; 17(1): 17ï 27.

METOKI, N.; SATO, Y.; OKUMURA, K.; IWAMOTO, J. Muscular atrophy in the hemiplegic thigh in patients after stroke. **Am J Phys Med Rehabil**, v.82, p.862ï 865, 2003.

NINDL B, ALEMANY JA, TUCKOW AP,RARICK KR, STAAB JS, KRAEMER J, MARESH CM, SPIERING BA, FLYVBJERG A. Circulating bioactive and immunoreactive IGF-I remain stable in women, despite physical fitness improvements after 8 weeks of resistance, aerobic, and combined exercise training and **Jan Frystyk J Appl Physiol**. 2010;109: 112-120,.

NOVAES D, MIRANDA AS, DOURADO. Velocidade usual da marcha em brasileiros de meia idade e idosos. **Rev Bras Fisioter**, 2011;(15): 2, p. 117-22.

NASCIUTTI-PRUDENTE C, OLIVEIRA FG, HOURI SF, DE PAULA GOULART FR, NETO MH, TEIXEIRA-SALMELA LF. Relationships between muscular torque and gait speed in chronic hemiparetic subjects. Disabil Rehabil. 2009;31(2):103-8.

ONDER G, LIPEROTI R, RUSSO A, Soldato M, Capuluongo E, Volpato S, Cesari M, Ameglio F, Bernabei R, Landi F. Body mass index, free insulin-like growth factor I, and physical function among older adults: results from the ilSIRENTE study. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**2006; 291: E829ï E834.

OPARA JA, JARACZ K. Quality of life of post-stroke patients and their caregivers. **J Med Life.** 2010;3(3):216-20.

ORGANIZA¢ ë O MUNDIAL DA SAÐDE. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. Published by the World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization. 2011.

PAK S E PATTEN C. Strengthening to Promote Functional Recovery Poststroke: An Evidence-Based Review. **Top Stroke Rehabil** 2008;15(3):177ï 199.

PATTEN C, LEXELL J, BROWN HE. Weakness and strength training in persons with poststroke hemiplegia: rationale, method, and efficacy. **J Rehab Res Dev.** 41(3A):293-312, 2004.

PLOUTZ-SNYDER LL, CLARK BC, LOGAN L, TURK M. Evaluation of spastic muscle in stroke survivors using magnetic resonance imag- ing and resistance to passive motion. Arch Phys Med Rehabil. 2006;87:1636ï 1642..

PRADO-MEDEIROS CL, SILVA MP, LESSI GC, et al. Muscle atrophy and functional deficits of knee extensors and flexors in people with chronic stroke. **Phys Ther.** 2012;92:429ï 439.

RAMSAY, J.W.; BARRANCE, P.J.; BUCHANAN, T.S.; HIGGINSON, J.S. Paretic muscle atrophy and non-contractile tissue content in individual muscles of the post-stroke lower extremity. J **Biomechanics**. 2011; v.44, n.16, p.2741ï 2746,.

ROSAMOND W, FLEGAL K, FURIE K, GO A, GREENLUND K, HAASE N; HAILPERN SM, HO M, HOWARD V, KISSELA, KITTNER S, LLOYD-JONES D, et al. Heart Disease and Stroke Statisticsð 2008 Update A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee . **Circulation**. 2008; 117: e25-e146.

ROSENDAL L, LANGBERG H, FLYYVBJERG A, FRYSTYK J, ORSKOV H, KJAER M. Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. J Appl Physiol. 2002; 93: 1669ï 1675.

ROSS R, RISSANEN J, PEDWELL H, CLIFFORD J, SHRAGGE P.Influence of diet and exercise on skeletal muscle and visceral adipose tissue in men. J Appl Physiol. 1996 Dec;81(6):2445-55.

RYAN, AS.; DOBROVOLONY, CL.; SMITH, GV; SILVER, K.H., MACKO, R.F. et al. Hemiparetic muscle atrophy and increased intramuscular fat in stroke patients. **Arch Phys Med Rehab.** 2002; 83: p.1703ï 1707.

RICHARDS CL, OLNEY S. Hemiparetic gait following stroke. Part II: Recovery and physical therapy. Gait Posture. 1996;4(2):149-62.

SCHMID A, DUNCAN PW, STUDENSKI S, LAI SUM, RICHARDS L, PERERA S, WU SS. Improvements in speed-based gait classifications are meaningful. **Stroke**. 38:2096-2100, 2007.

SCICCHITANO BM, RIZZUTO E, MUSARď. A Counteracting muscle wasting in aging and neuromuscular diseases: the critical role of IGF-1. **AGING**,2009;1:5.

SHARP SA, BROWER BJ. Isokinetic strength training of the hemiparetic knee: effects on function and spasticity. Arch Phys Med Rehabil. 1997;78:1231ï 1236.

SHERRYLINE JOGIE-BRAHIM, DAVID FELDMAN, YOUNGMAN OH. Unraveling Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Actions in Human. **Dis End Rev**. 2008; 30 (5): 417-437.

SMEDT AD, UYTTENBOOGAART M, RAEDT SD, MOENS M, WILCZAK N, LUIJCKX GJ, KEYSER JD. Insulin-Like Growth Factor I Serum Levels Influence Ischemic Stroke Outcome. **Stroke**. 42:2180-2185, 2011.

SOUSA CO, BARELA JA, PRADO-MEDEIROS CL, SALVINI TF, BARELA AM. The use of body weight support on ground level: an alternative strategy for gait training of individuals with stroke. **J Neuroeng Rehabil**. 2009 Dec 1;6:43.

SUETTA C, CLEMMENSEN C, ANDERSEN JL, Magnusson SP, Schjerling P, Kjaer M. Coordinated increase in skeletal muscle fiber area and expression of IGF-I with resistance exercise in elderly post-operative patients. **Growth Horm** IGF Res. 2010;20(2):134-40.

SULLIVAN KJ, BROWN DA, KLASSEN T, et al. Effects of task-specific locomotor and strength training in adults who were ambulatory after stroke: results of the STEPS randomized clinical trial. **Phys Ther.** 2007;87:1580ï 1602.

SUNNERHAGEN, K.S.; SVANTERSSON, U.; LONN, L. Upper motor neuron lesions: their effect on muscle performance and appearance in stroke patients with minor motor impairment. **Arch Phys Med Rehab,** 1999;80:155ï 161.

TRACY BL, IVEY FM, JEFFREY METTER E, FLEG JL, SIEGEL EL, HURLEY BF. A more efficient magnetic resonance imaging-based strategy for measuring quadriceps muscle volume. **Med Sci Sports Exer**c. 2003 Mar;35(3):425-33.

TSENG B, BILLINGER PT, BYRON JG, KLUDING MP. Exertion Fatigue and Chronic Fatigue Are Two Distinct Constructs in People Post-Stroke. **Stroke**. 2010;14.

WADE DT. Measurement in neurological rehabilitation. Review. Curr Opin Neurol Neurosurg. 1992 Oct;5(5):682-6.

WARE JE, SHERBOURNE CD. MOS-36 item short form health survey (SF-36): conceptual framework and item selection. **Med Care.** 1992;30: 473ï 483.

WARE, J.E. SF-36 Health Survey Update . **SPINE.** 2000; 25, (24), 3130ï 3139

YAROSH CA, HOFFMAN DS, STRICK PL. Deficits in movements of the wrist ipsilateral to a stroke in hemiparetic subjects. **J Neurophysiol.** 2004;92:3276ï 85.

ANEXO I

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
Departamento de Fisioterapia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Voc° est§ sendo convidado para participar da pesquisa ñ*Correlação dos níveis de concentração sérica de IGF-I e IGFBP-3 com o desempenho e o volume muscular indivÍduos hemiparéticos crônicos*ò.

2. Voc° foi selecionado atrav®s da lista de inscri-«o da Unidade Sa¼de Escola da Universidade Federal de S«o Carlos ou foi recrutado na comunidade local atrav®s de divulga-«o em r§dio, panfleto e cartazes e sua participa-«o n«o ®obrigat· ria.

3. O objetivo deste estudo ®avaliar o volume e o desempenho dos m½sculos extensores do joelho e correlacion§-los aos n²veis s®ricos de IGF-I e IGFBP-3 em indiv²duos hemipar®ticos cr¹nicos e saud§veis.

4. Sua participa-«o nesta pesquisa consistir§ em (1) avalia-«o cl²nica e o enquadramento nos crit®rios de inclus«o deste estudo (2) avalia-«o no equipamento dinam¹metro isocin®tico (verifica-«o da for-a dos m½sculos da coxa) (3) avalia-«o por Resson©ncia Nuclear Magn®tica (exame de imagem dos m½sculos da coxa) (4) avalia-«o por eletromiografia (aquisi-«o da atividade el®trica do m½sculo da coxa), (5) avalia-«o da fun-«o motora de membros inferiores por meio de teste (escala Fugl-Meyer) (6) realiza-«o de uma coleta de sangue de 20ml que correspondem a dois tubinhos pequenos.

5. Todos os procedimentos ser«o realizados por profissionais treinados e qualificados.

6. Quaisquer d¼vidas a respeito dos procedimentos e da sua participa-«o na pesquisa ser«o esclarecidas antes e durante o curso de pesquisa pelo pesquisador respons§vel, identificado no fim deste texto.

7. A qualquer momento voc° pode desistir de participar e retirar seu consentimento, sendo que isso n«o trar§ nenhuma penaliza-«o ou preju²zo em sua rela-«o com o pesquisador ou com a institui-«o.

8. As informa-»es obtidas atrav®s dessa pesquisa ser«o confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participa-«o. Os dados n«o ser«o divulgados de forma a possibilitar sua identifica-«o, sendo que os arquivos gerados no processo de avalia-«o ser«o identificados a partir de uma numera-«o.

9. Este estudo est§ firmado na condi-«o de que oferece baixo risco ¨ sa¼de do participante. As avalia-»es s· ser«o realizados mediante ao resultado positivo do exame de aptid«o f²sica realizado por um m®dico e a condi-«o suficiente de independ°ncia e funcionalidade avaliados por fisioterapeuta. A

Resson©ncia Nuclear Magn®tica s· ser§ realizada na aus°ncia de pr·tese met§lica ou marca-passo card²aco. No caso de pacientes de g°nero feminino, se estiver gr§vida ou amamentando n«o realizar§ este exame.

10. Voc° ser§ cuidadosamente monitorado quanto a frequ°ncia card²aca e a press«o arterial. Caso algum procedimento promova dor ou desestabiliza-«o dos sinais vitais (hipertens«o arterial e batimentos card²acos) ser§ interrompido. Se necess§rio ser§ encaminhado para uma unidade de sa¼de mais pr· xima.

11. Dentre os benef²cios que este estudo promove est§ o acesso a avalia-«o minuciosa e de alto custo e tecnologia. Ser§ oferecido material educativo com objetivo de promover altera-»es na qualidade de vida atrav®s de incentivo ¨ preven-«o do AVC. Ser«o oferecidas orienta-»es realizadas referentes ao cuidado do paciente neurol· gico**.**

12. Voc° ser§ isento de qualquer despesa que envolva a sua participa-«o nesta pesquisa.

13. Voc° receber§ uma c· pia deste termo onde consta o telefone e o endere-o do pesquisador principal, podendo tirar suas d¼vidas sobre o projeto e sua participa-«o, agora ou a qualquer momento.

_____

Prof Dr.Thiago Luiz Russo

Rodovia Washington Luiz, km 235. Universidade Federal de S«o Carlos, Departamento de Fisioterapia. **Fone: 3351-8345 Pesquisadores responsáveis: Prof.: Thiago Luiz Russo, Profa. Christiane L. P. Medeiros e Marcela de A S.Couto.**

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benef²cios de minha participa-«o na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi *aprovado* pelo Comit° de £tica em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pr· -reitoria de p· s-gradua-«o e Pesquisa da Universidade Federal de S«o Carlos, localizada na Rodovia Wshington Luiz Km. 235- Caixa Postal 676- CEP 13.565-905- S«o Carlos-SP-Brasil. Fone (19) 3351-8110. Endere-o eletr¹nico cephumanos@power.ufscar.br

_____

Ass. do Voluntário

ANEXO II

Authors:

Carolina Ramírez, MS
Thiago Luiz Russo, PhD
María Cristina Sandoval, MS, PhD
Adriana Abbade Dentillo, PT
Marcela Abreu Silva Couto, PT
João Luiz Quagliotti Durigan, MS, PhD
Tania Fátima Salvini, MS, PhD

Affiliations:

From the Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil (CR, TLR, MCS, AAD, MASC, JLQD, TFS); and School of Physical Therapy, Industrial University of Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia (CR, MCS).

Correspondence:

All correspondence and requests for reprints should be addressed to: Tania F. Salvini, MS, PhD, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, CxP 676, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Disclosures:

This project was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process 07/5474-3). C. Ramirez, T.L. Russo, and J.L.Q. Durigan were PhD and postdoctoral fellows from FAPESP (process 08/10663-9, 08/05237-0, 08/09408-4, respectively).
Financial disclosure statements have been obtained, and no conflicts of interest have been reported by the authors or by any individuals in control of the content of this article.

0894-9115/11/9011-0930/0
American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation

DOI: 10.1097/PHM.0b013e31822dea3c

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Joint Inflammation Alters Gene and Protein Expression and Leads to Atrophy in the Tibialis Anterior Muscle in Rats

ABSTRACT

Ramirez C, Russo TL, Sandoval MC, Dentillo AA, Couto MAS, Durigan JLQ, Salvini TF: Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. Am J Phys Med Rehabil 2011;90:930–939.

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of tibiotarsal joint inflammation in rat tibialis anterior muscle through muscle fiber cross-sectional area (CSA) and gene expression (atrogin-1, muscle ring finger–1 [*MuRF1*], myogenic differentiation-1 [*MyoD*], p38 mitogen-activated protein kinase [*p38MAPK*], nuclear factor kappa B–dependent [*NFκB*], tumor necrosis factor–alpha [*TNF-α*]).

Design: Wistar rats were randomly divided into three periods (2, 7, and 15 days) and assigned into four groups within each experimental period: control, sham, inflammation, and immobilization. Real-time polymerase chain reaction, Western blot, immunofluorescence, and muscle fiber CSA analyses were performed.

Results: At 2 days, the inflammation group increased atrogin-1, *MuRF1*, and myostatin and reduced *MyoD* expression. At 7 days, the inflammation group increased atrogin-1, *MuRF1*, *NFκB*, *p38MAPK*, *MyoD*, myostatin, and *TNF-α* expression and TNF-α protein and reduced muscle fiber CSA. At 15 days, gene and protein expression in the inflammation group returned to basal levels, and CSA values were similar to those in control and sham groups. The immobilization groups have a similar pattern in all experimental periods, with increased atrogin-1, *MuRF1*, *NFκB*, and *TNF-α* gene expression and reduced muscle fiber CSA. The sham group had increased myostatin and atrogin-1 expression at 2 days and increased *MyoD* and myostatin expression at 7 days.

Conclusions: Joint inflammation stimulated the expression of muscle factors related to atrophy, growth, differentiation, and mass regulation followed by muscle atrophy.

Key Words: Skeletal Muscle, Joint Inflammation, Gene Expression, Rehabilitation

According to clinical studies, morphologic and functional alterations occur in muscles related to an injured joint.[1–3] Many joint diseases have been studied, including rheumatoid arthritis, osteoarthritis, ligament and meniscus injuries, and exploratory joint procedures such as arthroscopy.[1–4] In all of these conditions, inflammation is a common characteristic sign.

Inflammation consists of cellular and humoral responses after an injury, in which the body attempts to restore the tissue to its preinjury state. This response can be acute or chronic.[5] Muscle atrophy is an adaptation observed frequently in muscles related to joint inflammation.[3,4] Muscle atrophy is a highly regulated and ordered process that results in reduced muscle fiber cross-sectional area (CSA), protein content and force,[6] increased fatigue and insulin resistance,[3] and transformation of type I fibers into type II fibers.[6,7]

Despite the indication that joint inflammation causes atrophy in muscles functionally related to the affected joint, the molecular mechanisms involved in this process remain unclear. An animal model of inflammation useful to the study of this subject is the intra-articular injection of carrageenan. It is considered a valid experimental tool in investigating the inflammatory process and hyperalgesia in rats.[8] According to a previous study, carrageenan increases circulating inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor–alpha (TNF-α),[9] a key factor that is able to activate muscle atrophy.[7,10] Elevation of TNF-α leads to the upregulation of muscle ring finger–1 (*MuRF1*)[11] and muscle atrophy Fbox (*MAFbx*/atrogin-1),[12] which are two important genes related to the ubiquitin–proteasome pathway and muscle atrophy in rats and humans.[7,10,13–15] According to animal models, upregulation of *MuRF1* and *MAFbx*/atrogin-1 occurs through the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Nuclear Factor kappa B–dependent (NFκB) pathways, respectively.[7,11,12]

Early studies established that atrogin-1 and *MuRF1* are induced in animal models of muscle atrophy (i.e., immobilization, denervation, hindlimb suspension, and fasting) and in human muscles during systemic diseases associated with cachexia, providing evidence of a common program for protein degradation and muscle atrophy that is independent of etiology.[13–15] On the other hand, p38, a member of the MAPK family, is thought to be a regulator of muscle metabolism. An in vitro study showed that differentiated muscle cells stimulated by TNF-α had increased expression of p38 and atrogin-1. In addition, pharmacologic inhibitors of p38 were able to block atrogin-1 upregulation.[11]

In addition, the p65/p50 dimer is an important part of the NFκB family and is associated with muscle atrophy. This dimer is activated and translocates into the nucleus, where it binds to specific DNA sites and regulates expression of *MuRF1*.[12] Therefore, upregulation of NFκB has been associated with the positive regulation of *MuRF1* and the degradation of muscle proteins.[12]

In addition, other factors that are involved in skeletal muscle regulation are related to the ubiquitin–proteasome pathway and include the myogenic regulatory factors. Myogenic regulatory factors are a group of basic helix-loop-helix transcription factors, and myogenic differentiation-1 (MyoD) is its most important member.[16] MyoD stimulates myogenic proliferation and differentiation and participates in adaptive processes in adult skeletal muscle.[17] Elevated expression of atrogin-1 promotes MyoD degradation, and, through this mechanism, atrogin-1 can regulate muscle differentiation.[18]

Myostatin is another important gene involved in the control of skeletal muscle mass and could be involved in the response of skeletal muscles related to an inflamed joint. This gene is a negative regulator of muscle growth that is able to inhibit myoblast proliferation without increasing apoptosis.[16] Myostatin is expressed in developing and adult muscles in response to different stimuli; it is upregulated in immobilized muscle and is downregulated in stretched or electrically stimulated denervated muscle.[16] Furthermore, a previous study showed that upregulation of myostatin was associated with increased MyoD expression in stretched muscles.[19]

Despite clinical evidence suggesting that muscles related to an injured joint can be more sensitive to atrophy and force loss,[1–4] the molecular mechanisms related to muscle adaptation in the presence of joint inflammation and the possible changes in the CSA of muscle related to the injured joint are unclear. Investigation of this problem is clinically relevant and could provide new information on the treatment and recovery of muscles functionally related to an inflamed joint. Our hypothesis is that tibiotarsal joint inflammation activates muscle atrophy pathways in rat tibialis anterior muscle (TA), which is functionally related to the injured joint. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of tibiotarsal joint inflammation on the messenger RNA (mRNA) levels of genes related to atophy (atrogin-1 and *MuRF1*), differentiation and growth (MyoD), mass regulation (myostatin), and proinflammatory factors (p38MAPK, NFκB, and TNF-α) and the

expression of *TNF*-α protein in the rat TA muscle. In addition, changes in the muscle fiber CSA were also assessed.

METHODS

Animal Care and Experimental Groups

This study was conducted in accordance with the National Guide for Care and use of Laboratory Animals and with the approval of the University Ethics Committee (protocol number 049/2007). Sixty Wistar rats (body weight, 310 ± 12 g; age, 3 mos) were used. The animals were housed in plastic cages in a room with controlled environmental conditions and had free access to water and standard food. The animals were randomly divided into three experimental periods: 2 days (n = 20), 7 days (n = 20) and 15 days (n = 20). They were further assigned randomly into four groups within each experimental period: control (n = 5), sham (n = 5), inflammation (n = 5), and immobilization (n = 5). The immobilization group was used as a reference for comparing the possible effects of hindlimb movement restriction caused by inflammation. The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (95 mg/kg) for all experimental procedures. After they were weighed and anesthetized, the animals from the inflammation and sham groups were injected with ι-carrageenan or saline solution, respectively, into the right tibiotarsal joint. Joint inflammation was induced using 0.03 ml of 3% ι-carrageenan (Sigma Chemical Company, St. Louis, United States) dissolved in saline solution (0.9% NaCl), as described by Wang et al.[20] Briefly, the foot was placed in a neutral position and a 26-gauge needle was introduced into the fossa located distally and medially to the lateral malleolus until it reached the joint capsule. After the needle entered the joint space, as evidenced by the end of resistance, the solution was injected. The sham group was submitted to the same procedure for injection of 0.03 ml of saline solution. The immobilization group was immobilized according to Coutinho et al.,[21] and the right tibiotarsal joint was immobilized in a neutral position to avoid possible stretching or shortening effects on the analyzed muscles. Neutral position was defined by the resting arrangement of the hindlimb with the animal anesthetized. After the experimental procedures, all of the animals remained free in their cages for 2, 7, or 15 days without restriction of their movement, except for the immobilization group.

After the experimental time course (2, 7, and 15 days), the right TA muscle was carefully dissected and removed. The muscle was weighed and then divided in half at the middle belly. The proximal fragment was divided in half again, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C (Forma Scientific, Marietta, OH); the fragments were used for the mRNA and protein expression analyses. Distal fragments of the muscle were frozen in isopentane in liquid nitrogen, stored at −86°C, and used for histologic, immunofluorescence, and muscle fiber CSA measurements. After muscle removal, animals were euthanized with an overdose of anesthesia.

Muscle Fiber CSA Analysis

Histologic cross-sections (10 μm) from the middle belly of each right TA muscle were obtained using a cryostat (Micron HE 505, Jena, Germany), stained with Toluidine Blue/1% Borax and analyzed by light microscopy (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) to evaluate the muscle fiber CSA. Images were obtained using a light microscope equipped with a digital camera (Sony DSCs75, Tokyo, Japan). The CSAs of 100 randomly chosen fibers were measured using Axiovision 3.0.6 SP4 software (Carl Zeiss, Jena, Germany). All measurements were made by a blinded evaluator.

RNA Isolation and Analysis

One frozen fragment from each right TA muscle was homogenized, and total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations. Extracted RNA was dissolved in Tris-HCl and ethylene-diaminetetracetic acid pH 7.6, and its concentration was quantified spectrophotometrically. RNA purity was assessed by determining the ratio of the absorbance at 260 nm to 280 nm (ratios were between 1.8 and 2.0). The integrity of RNA was confirmed through electrophoretic analysis of the 18S and 28S ribosomal RNAs, which were stained using ethidium bromide (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Reverse Transcription

One microgram of total RNA was used to synthesize complementary DNA. The reverse transcription reaction mixture contained 5× first-strand buffer, a dNTP (Promega, Madison, WI) mixture with 0.2 mmol/l each of deoxyadenosine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, and deoxyguanosine triphosphate and 0.1 mol/l of deoxythymidine triphosphate, 1 μl of oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 200 U of Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcription enzyme (Promega, Madison, WI).

The reverse transcription reaction was incubated at 70°C for 10 mins, at 42°C for 60 mins, and at 95°C for 10 mins before quick chilling on ice.

Analyses by Real-Time Polymerase Chain Reactions

RNA transcript levels for the different experimental and control muscles were analyzed simultaneously, and the reactions were performed in duplicate in a Lightcycler (Rotor Gene 3000; Cobertt Research, San Francisco, CA) using SYBR Green fluorescent dye detection (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 180 nM of each primer in a final volume of 50 μl. The cycling conditions for the target genes were previously described.[16,19] Data were analyzed using the comparative cycle threshold method described by the manufacturer; glyceraldehydephosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was the control gene. In Figure 2, the control levels are arbitrarily set to 1. Negative controls contained RNA but no M-MLV reverse transcription, ensuring that the product of polymerase chain reaction was not a result of amplified genomic DNA. A blank control that only contained water, primers, and SYBR Green was also performed.

Oligonucleotide Primers

Oligonucleotide primers were designed for GAPDH (GenBank, AF106860), atrogin-1 (GenBank AF441120) and myostatin (GenBank AF019624) using the Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers used for the amplification of products were as follows: GADPH, Fw-GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG, Rv-GTGGTGC AGGATGCATTGCTGA; atrogin-1, Fw-TACTAAGGAG CGCCATGGATACT, Rv-GTTGAATCTTCTGGATCCAG GAT; *MuRF1*, Fw-TGTCTGGAGGTCGTTTCCG, Rv-ATGCCGGTCCATGATCACTT; myostatin, Fw-CTAC CACGG-AAACAATCATTACCA, Rv-AGCAACATTTGGG CTTTCCAT; MyoD, Fw-GGAGACATCCTC-AAGCGAT GC, Rv-AGCACCTGGTAAATCGGATTG; p38MAPK, Fw-AGCTGAACAAGACAATC-TGGGA, Rv-CATAGGCG CCAGAGCCC; NFκB, Fw-CATTGAGGTGTATTTCAC GG, Rv-GGC-AAGTGGCCATTGTGTTC.

Western Blot Analysis

Protein was extracted from muscles in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% wt/vol Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM sodium chloride, 1 mM phenyl methylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM sodium fluoride). Equal amounts of protein from each muscle lysate were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were stained with Ponceau S to confirm protein transfer and then rinsed with Tris buffered saline with Tween (TBST). Membranes were blotted with antibodies against TNF-α (1:300, Santa Cruz Biotechnology, sc-80383). After incubation, the membranes were rinsed in TBST and incubated with a secondary antibody against goat immunoglobulin G(IgG) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD; 14-13-06; 1:2000, 0.1% nonfat dried milk in TBST). Detection of the labeled protein was done using the enhanced chemiluminescence system (Amersham, UK).

Immunofluorescence Analysis

The primary antibody used for immunostaining was rabbit anti–TNF-α (1:200 dilution, catalog no. NBP1-19532; Novus Biologicals, Littleton, United States), and the secondary antibody was rhodamine red goat anti–rabbit IgG (1:200 dilution, catalog no. Rb394; Molecular Probes, Eugene, OR). The muscle cross-sections used for immunostaining for TNF-α were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma P6148) in 0.2 M phosphate buffer (PB) for 10 mins at room temperature, blocked with 0.1 M glycine in PB for 5 mins, and permeabilized in 0.2% Triton X-100-PB for 10 mins. Subsequently, the sections were incubated in 1% bovine serum albumin for 20 mins at room temperature to block nonspecific binding and were incubated with the primary antibody (diluted in 1% bovine serum albumin) overnight at 4°C. After the slides were washed with 0.1 M PB (3 times for 10 mins each), they were incubated with the secondary antibody (diluted in 1% bovine serum albumin) for 2 hrs in a dark room. The slides were washed in 0.1 M PB (3 times for 10 mins each) and were mounted with Vectashield mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (catalogue no. H-1200; Vector Laboratories). Negative control sections were not incubated with the primary antibody, and experimental results were considered only if these controls did not show immunoreactivity. Analyses were performed by obtaining photomicrographs (20× magnification) of the stained sections using a fluorescence microscope (Axiolab; Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a rhodamine filter and a digital camera (Sony DSC s75; Tokyo, Japan).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using STATISTICA 5.5 statistical software. Shapiro-Wilk and Levene tests were applied to evaluate the normality and homogeneity, respectively, of the results.

One-way analysis of variance, followed by a Tukey test, was performed to compare the groups. Nonparametric data were analyzed using a Kruskal-Wallis test followed by a Newman-Keuls test. For all tests, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Muscle Fiber CSA

Only the immobilization group showed a significant reduction ($P < 0.05$) in muscle fiber CSA at 2 days compared with the control (697 ± 220 and 1702 ± 110 μm^2, respectively; Fig. 1). At 7 days, both the inflammation and immobilization groups had decreased muscle fiber CSAs (1110 ± 154 and 1360 ± 198 μm^2, respectively) compared with the control (1849 ± 220 μm^2; $P < 0.01$); however, there was no difference between them (Fig. 1). At 15 days, only the immobilization group showed reduced muscle fiber CSA (1195 ± 189 μm^2) compared with the control (1997 ± 356 μm^2; $P < 0.05$; Fig. 1).

Gene Expression

Atrogin-1

Our data showed increased expression of atrogin-1 after 2 days in the inflammation, immobilization, and sham groups (14.7-fold, 11.6-fold, and 6.3-fold, respectively) compared with the control group (Fig. 2*A*). This upregulation remained at 7 days in both the inflammation and immobilization groups ($P < 0.01$); however, mRNA levels decreased to 7.31-fold in the inflammation group ($P < 0.01$) and to 2.67-fold in the immobilization group ($P < 0.01$; Fig. 2*A*). At 15 days, high levels of atrogin-1 expression were found only in the immobilization group (Fig. 2*A*).

MuRF1 Gene

MuRF1 gene expression increased at 2 days in both the inflammation and immobilization groups (7.7-fold and 10-fold, respectively) compared with the control (Fig. 2*B*), and the expression remained elevated at 7 days in both groups (9.7-fold and 4.8-fold, respectively). After 15 days, *MuRF1* gene expression in the inflammation group returned to basal levels, whereas upregulation was maintained in the immobilization group (Fig. 2*B*).

NFκB Gene

NFκB gene expression was increased by 6.1-fold in the immobilization group at 2 days and remained elevated at 7 and 15 days compared with the control group ($P < 0.01$). However, *NFκB* mRNA levels decreased drastically ($P < 0.01$) at 7 and 15 days (1.9-fold and 1.7-fold, respectively, Fig. 2*C*) compared with 2 days. In the inflammation group, gene expression increased only at 7 days (2-fold) and returned to basal levels at 15 days (Fig. 2*C*).

p38MAPK Gene

In the immobilization group, this gene was significantly upregulated at 2 days (3-fold; $P < 0.01$), and its expression then decreased to basal levels at 7 and 15 days (Fig. 2*D*). At 7 days, elevated *p38MAPK* expression was detected only in the inflammation group (2.4-fold), and the expression returned to basal levels after 15 days (Fig. 2*D*).

MyoD Gene

MyoD mRNA levels decreased ($P < 0.01$) in the inflammation (0.3-fold) and immobilization groups (0.2-fold) at 2 days compared with the control groups (Fig. 2*E*). *MyoD* gene expression was increased drastically at 7 days in both groups, although a greater increase was observed in the inflammation group (11.3-fold; $P < 0.001$; Fig. 2*E*). The sham group also had increased *MyoD* expression at 7 days (1.9-fold). At 15 days, the expression in all groups returned to basal levels (Fig. 2*E*).

Myostatin

Myostatin expression was increased at 2 days ($P < 0.005$) in the sham (2.0-fold) and inflammation

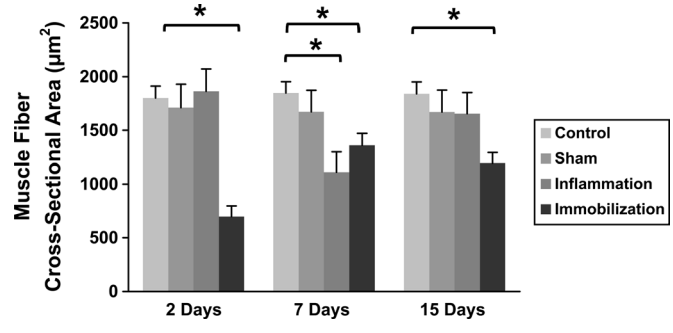


FIGURE 1 *Cross-sectional area of rat tibialis anterior muscle fibers of control, sham, inflammation, and immobilization groups at 2, 7, and 15 days. Data are expressed as mean ± SD. *P < 0.05 vs. control.*

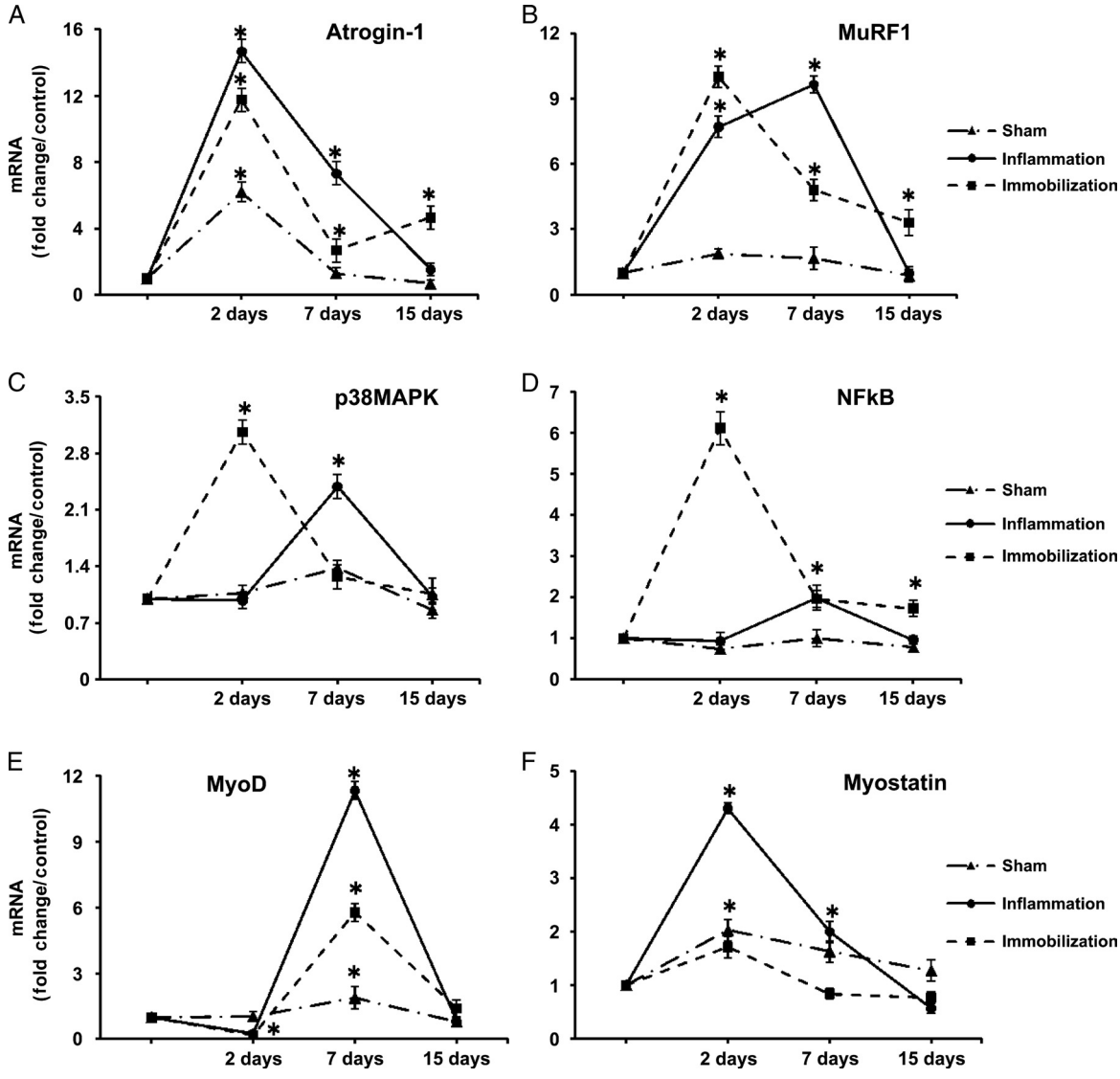


FIGURE 2 *Gene expression of Atrogin-1 (A), MuRF1 (B), NFκB (C), p38MAPK (D), MyoD (E), and myostatin (F) in the tibialis anterior muscle of the sham, inflammation, and immobilization groups at the 2, 7, and 15 days. Data are expressed as mean ± SD. *P < 0.05 vs. control. In (D) at 7 days, * indicates the difference on both inflammation and immobilization groups compared with control; in (E) at 2 days, * represents the significant difference on both inflammation and immobilization groups compared with control; and in (F) at 7 days, * represents the significant difference in both sham and inflammation groups compared with control.*

groups (4.3-fold; Fig. 2*F*). This overexpression remained at 7 days in both groups. However, the expression in the inflammation group was reduced(2.0-fold; $P < 0.001$) when compared with its expression at 2 days (Fig. 2*F*). At 15 days, myostatin expression returned to basal levels in all experimental groups (Fig. 2*F*).

TNF-α Gene

TNF-α gene expression was increased at 7 days in the inflammation and immobilization groups compared with the control group ($P < 0.05$), although the increase in mRNA levels was more pronounced in the inflammation group (20.7-fold; $P < 0.001$) when compared with the immobilization group (10.8-fold; $P < 0.01$) (Fig. 3*B*). After 15 days, *TNF*-α expression returned to basal levels in all groups (Fig. 3*B*).

TNF-α Protein Expression

Representative blots shown in Figure 3*A* are presented above their respective membranes stained with Ponceau S. Qualitative Western blot analysis showed that, at 2 days, TNF-α protein increased in all of the experimental groups compared with the control group. At 7 days, the inflammation group showed a strong increase in protein levels (Fig. 3*A*) compared with the control group; the sham and inflammation groups also exhibited a milder increase (Fig. 3*A*). At 15 days, TNF-α protein expression

decreased in the immobilization group, whereas the other groups presented a slight increase in the expression compared with the control group (Fig. 3*A*).

TNF-α Immunofluorescence

Qualitative analysis of the immunofluorescence staining for TNF-α showed an increased immunoreactivity in all experimental groups; however, TNF-α was barely detected in the control groups (Fig. 3*C*). Generally, muscle fibers expressing TNF-α were detected in the endomysium area of the TA muscle (represented by arrows). TNF-α was more highly expressed around some muscle fibers (asterisk), whereas in other muscle fibers, TNF-α was not visible. There was a visible immunoreactivity in the inflammation and immobilization groups at 7 days compared with the control group (Fig. 3*C*). In some muscle fibers, increased reactivity at 7 days was co-localized with myonuclei (Fig. 3*C*-merged). The negative control showed no staining.

DISCUSSION

Effect of Joint Inflammation on TA Muscle

This study presented new information about how joint inflammation induced by ι-carrageenan can regulate muscle fiber CSA, gene expression, and protein content in the rat TA muscle. Early

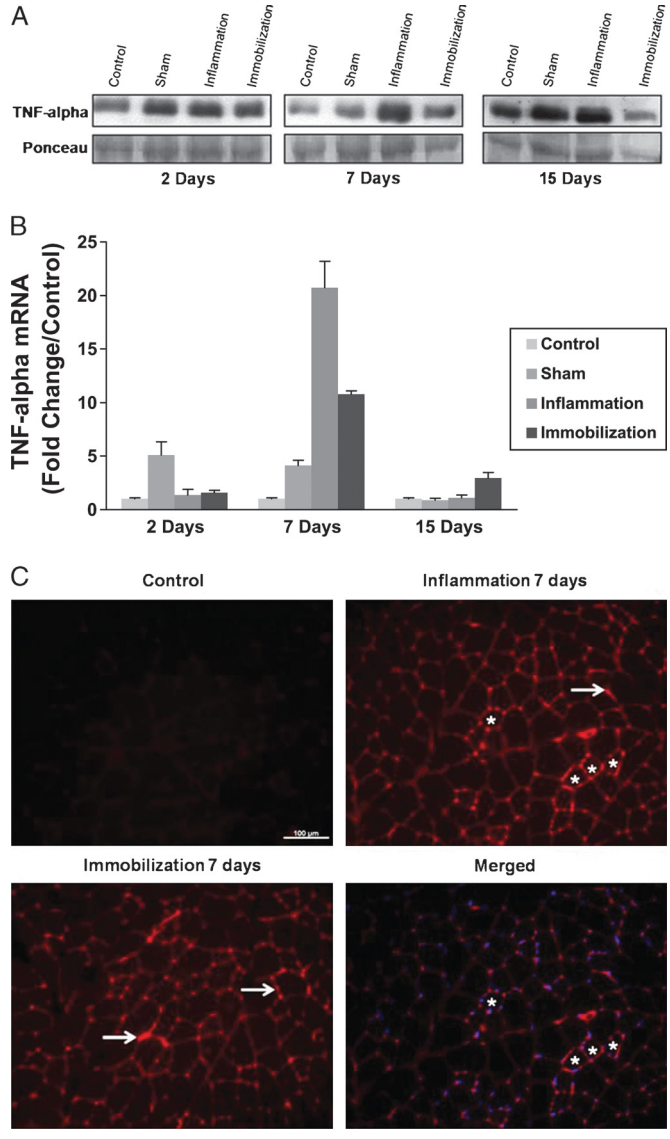


FIGURE 3 *A, Representative Western blots of TNF-α in control, sham, inflammation, and immobilization groups at 2, 7, and 15 days are shown in the top row, with its respective bands stained with Ponceau S in the lower row. B, Gene expression of TNF-α in control, sham, inflammation, and immobilization groups at 2, 7, and 15 days. Data are presented as mean ± SD; *P < 0.05 compared with control. C, Representative immunoflourescence analysis of TNF-α for control, inflammation at 7 days, and immobilization at 7 days is showed. White arrows indicate endomysium immunoreactivity and * designates the TNF-α expressed mainly around some muscle fibers. TNF indicates Tumor Necrosis Factor.*

studies using this inflammatory model showed that, 2 days after intra-articular injection, an acute inflammatory response occurs. This acute response is converted into a macrophage-dominated chronic inflammation by 1 wk and lasts through 8 wks.[8] Therefore, in our study, the molecular response observed in the inflammation group at 2 and 7 days could be considered as a muscle adaptation in response to an acute and chronic joint inflammation, respectively.

Our results showed that, in the inflammation group, expression of atrogin-1 and *MuRF1* genes increased in the first 2 days, but no muscle fiber CSA reduction was observed (Figs. 1; 2*A*, *B*). These data suggest that although the molecular mediators of the muscle atrophy pathway were activated, 2 days was not sufficient to detect any reduction in the muscle fiber CSA. Interesting, neither *TNF*-α gene expression nor its protein content was altered by joint inflammation at 2 days.

At 7 days, atrogin-1 expression decreased in the inflammation group compared with the levels observed at 2 days, but it remained elevated when compared with control values. *MuRF1* expression increased at 7 days when compared with 2 days. These changes in atrophy-related gene expression were followed by muscle fiber atrophy (Figs. 1; 2*A*, *B*). Chronic joint inflammation and proinflammatory factors found in our study at 7 days (Fig. 2*C*, *D*) likely influenced this response.

After 7 days of induced joint inflammation, the levels of atrogin-1, *MuRF1*, and proinflammatory factor–related genes, such as *NFκB* and *p38MAPK*, increased. TNF-α protein and mRNA levels were also elevated. These results suggest that chronic joint inflammation stimulates the TNF-α pathway, which leads to atrophy[7,8,22] in the TA muscle functionally related to that joint. Therefore, TNF-α could upregulate *NFκB* and *p38MAPK* to increase the expression of atrogin-1 and *MuRF1*, respectively. However, other factors such as interferon-γ, IL-6, and IL-1 could have participated in the molecular response described. Future studies investigating these molecular mediators and their interactions with the hypertrophy pathway (IGF/IP3/Akt) and Forkhead family of transcription factors are necessary. Recently, López-Menduiã et al.[23] showed that the administration of IGF-1 two times a day improved gastrocnemius muscle weight in an animal model of rheumatoid arthritis. They also observed that IGF-1 attenuated arthritis-induced increase in atrogin-1 and *MuRF1* expressions in this muscle, suggesting the protective effect of IGF-1 on skeletal muscle affected by arthritis. These results confirm the main relation of IGF-1 pathway and the muscle atrophy mechanisms in inflammatory conditions.

At 15 days of joint inflammation, all genes related to muscle atrophy mediated by the TNF-α pathway returned to basal levels, and muscle fiber CSA was also recovered. These results clearly demonstrate that basal levels of TNF-α are related to muscle fiber CSA recovery on the 15th day. In addition, these results suggest that joint inflammation induced by ι-carrageenan might be lapsing at 15 days. New studies using another carrageenan type such as λ-carrageenan[8,24] would help verify the expression of genes and proteins related to long-term joint inflammation.

On the other hand, MyoD downregulation in the inflammation group at 2 days could be related to elevated atrogin-1 expression. A previous study showed an interaction between atrogin-1 and MyoD[18] and suggested that atrogin-1 causes the ubiquitinization of MyoD, which leads to its degradation in the proteasome. Conversely, the atrogin-1/MyoD interaction was not present at 7 days (Fig. 2*A*–*E*), when atrogin-1 overexpression was also accompanied by MyoD upregulation. This result could be explained through the muscle atrophy exhibited at 7 days because it has been hypothesized that MyoD would be upregulated during muscle atrophy. Upregulation of MyoD could be an attempt to prevent muscle atrophy, as suggested by MyoD overexpression observed in the denervated muscle.[25] In our study, MyoD expression in the inflammation group returned to basal levels at 15 days, when no muscle fiber atrophy was observed.

Finally, joint inflammation increased myostatin gene expression at 2 days, suggesting a relationship between myostatin and *MyoD* expression. Rat immobilized muscles have increased myostatin expression and, at the same time, decreased *MyoD* expression. Myostatin expression causes an inability of myoblasts to exit from the cellular cycle, affecting myogenic differentiation.[26] Myostatin overexpression in the inflammation group at 7 days also suggests that this gene is related to muscle atrophy. Increased myostatin levels are associated with loss of skeletal muscle mass in conditions as disparate as AIDS wasting syndrome, exposure to microgravity during space flight and hindlimb suspension.[27] Our results suggest that chronic joint inflammation–induced muscle atrophy is also associated with the upregulation of myostatin.

The results of the present study could have implications to clinical practice. Early interventions should be indicated to prevent or detain deleterious modifications on skeletal muscles functionally related

to the affected joint. High-performance athletes could be beneficiated whether the rehabilitation team objectives, during the joint injury rehabilitation program, also include skeletal muscle activation (e.g., using exercises or electrical stimulation to reduce/control the atrophy pathway).

Effect of Immobilization on TA Muscle

Immobilization increased the expression of both atrogin-1 and *MuRF1*, as expected for a disuse model. Both genes were elevated at all experimental times (2, 7, and 15 days), and this overexpression was associated with muscle atrophy.

This regulation was in accordance with previous studies, which confirmed that the overexpression of both atrogin-1 and *MuRF1* has an essential role in muscle proteolysis.[10,13–15] The elevated oxidative stress caused by immobilization might trigger the molecular responses exhibited in this group and induce NFκB and/or FOXO signaling pathways, leading to an increase in proteolysis through the ubiquitin–proteasome pathway.[28] Corroborating to this hypothesis, TNF-α mRNA levels and protein content were elevated at 7 days but returned to normal values at 15 days.

The expression of *MyoD* in the immobilization group at 7 days was similar to the pattern observed in the inflammation group, and the mechanisms involved could be similar as those previously described.

Our work did not detect an increased expression of myostatin in the atrophied muscle related to immobilization. This result is similar to that of Wojcik et al.,[29] who evaluated the possible role of myostatin in type II fiber atrophy in human muscle. In their study, myostatin mRNA levels did not increase, but myostatin protein was detected through immunocytochemistry and immunoblotting. It is possible that increased myostatin detected only at the protein level was influenced by translational and/or posttranslational modulation.[29]

Effect of Intra-Articular Saline Injection on TA Muscle

Changes in the expression of *MyoD* and myostatin were detected in the sham group. Previous reports showed that saline injection into the tibiotarsical joint in rats does not cause an inflammatory response.[30] Therefore, in our opinion, the changes detected in the sham group could result from the arthrogenic muscle response caused by joint effusion. Arthrogenic muscle response is triggered by the increase in tension on the joint capsule. Studies in humans showed that it can alter the excitability of the alpha motoneurons (α-MN) of muscles functionally related to the joint, without any joint injury.[31] The decreased excitability of the α-MN related to joint effusion might be related to an increase in activity at slowly adapting Ruffini endings in the joint capsule. Activation of these receptors stimulates Ib inhibitory interneurons, resulting in α-MN pool inhibition of the agonist muscle.[31]

According to those previous studies, our results could suggest that joint effusion inhibits the α-MN pool in the TA muscle and regulates the expression of genes associated with muscle mass control and atrophy such as myostatin and atrogin-1 at 2 and 7 days but does not decrease muscle fiber CSA. Other studies are necessary to analyze the neural mechanisms involved in the reduction of α-MN activity and molecular adaptations in muscles when joint effusion is present. These aspects should be considered by the rehabilitation team because joint distension can interfere on the normal pattern of muscle recruitment, generating an unbalance between agonist and antagonist muscles, thus altering static and dynamic joint stability.

Study Limitation and Clinical Implications

The authors did not discharge that both movement restriction and capsular distension could exert some influence in the results of inflammation group, probably potentiating the effects of inflammation, especially on the first days of inflammation. Future studies should consider a follow-up of animals to access pain and movement restriction during the inflammation process, correlating these finds with muscle adaptation. Furthermore, this manuscript showed the atrophy on the entire muscle, and selective atrophy on different type of muscle fibers could be missed.

Although this study was performed in animals, it has clinical relevance and indicates the importance of therapeutic interventions in the acute phase of joint inflammation with the attempt to reduce the deleterious effects on muscles related to an injured joint.

In conclusion, our study confirmed the initial hypothesis that joint inflammation activates the proteolytic program on muscles functionally related to this joint, inducting genes related to proinflammatory, atrophy, and mass control pathways. In addition, muscle atrophy is only observed after 7 days of joint inflammation, and the recovery of muscle trophism is observed at 15 days, when transcriptional program is normalized.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Teresa F. F. Piassi for her technical support.

REFERENCES

1. Gür H, Çakin N: Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:1534–41
2. Hurley MV: The effects of joint damage on muscle function, propioception and rehabilitation. *Man Ther* 1997;2:11–7
3. Stockmar C, Lill H, Trapp A, et al: Fiber type related changes in the metabolic profile and fiber diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochem* 2006; 108:3335–42
4. Akima H, Furukawa T: Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthoscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13:632–7
5. Serhan C, Ward P, Gilroy D: *Fundamentals of Inflammation*. 1st ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2010:1–13
6. Lieber R: *Skeletal Muscle Structural, Function & Plasticity*. 2nd ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2002:225–55
7. Glass DJ: Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:1974–84
8. Radhakrishnana R, Moorec SA, Slukaa KA: Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 2003; 104:566–77
9. Nishikori T, Irie K, Suganuma T, et al: Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 2002;451:327–33
10. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al: Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:14440–5
11. Russo TL, Peviani SM, Duringan JL, et al: TNF-alpha acts via p38MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 2005;19:362–70
12. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, et al: IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004;119:285–98
13. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al: Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704–7
14. Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, et al: Rapid desuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J* 2007;21:140–55
15. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, et al: Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. *J Nutr* 1999;129:227S–37S
16. Russo TL, Peviani SM, Duringan JL, et al: Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2010;31:45–57
17. Saborin LA, Rudnick MA: The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 2000;57:16–25
18. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, et al: Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2005;280:2847–56
19. Peviani S, Silveira A, Carreira R, et al: Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 2007;35:363–70
20. Wang Y, Huang C, Cao Y, et al: Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sci* 2000;67:261–7
21. Coutinhho AL, Gomes A, Franca CN et al: A new model for the immobilization of rat hind limb. *Braz J Biol Res* 2004;37:1473–80
22. Langen RM, Van der Velden JL, Schols A, et al: Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J* 2004;18:227–37
23. López-Menduiña M, Martín AI, Castillero E, et al: Systemic IGF-1 administration attenuates the inhibitory effect of chronic arthritis on gastrocnemius mass and decreases atrogin-1 and IGFBP-3. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;299:R541–51.
24. Loram LC, Fuller A, Fick LG, et al: Cytokines profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J Pain* 2007;8:127–36
25. Ishido M, Kami K, Masuhara M: In vivo expression patterns of MyoD, p21 and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:484–93
26. Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, et al: The Myostatin gene is downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cel Biol* 2002;22:7066–82
27. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, et al: Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Meta* 2003;285:363–71
28. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Oxidative estress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand* 1991;142:527–32
29. Wojcik S, Nogalska A, Engel WK, et al: Myostatin and its precursor protein are increased in the skeletal muscle of patients with Type-II muscle fibre atrophy. *Folia Morphol* 2008;67:1–7
30. Saricaoglu F, Dal D, Atilla P, et al: Effect of intraarticular injection of lornoxicam on the articular cartilage & synovium in rat. *Indian J Med Res* 2008;127:362–5
31. Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA, et al: Arthrogenic muscle response to a simulated ankle joint effusion. *Br J Sports Med* 2004;38:26–30

ANEXO III

ISSN 1413-3555
Rev Bras Fisioter, São Carlos, v. 16, n. 4, p. 320-7, July/Aug. 2012
©Revista Brasileira de Fisioterapia

Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation

Efeitos do laser de baixa potência após reconstrução nervosa na adaptação do músculo sóleo de rato

Marcela A. Silva-Couto, Davilene Gigo-Benato, Carla R. Tim, Nivaldo A. Parizotto, Tania F. Salvini, Thiago L. Russo

Abstract

Background: Peripheral nerve injury (PNI) rehabilitation remains a challenge for physical therapists because PNI effects are very disabling. Low-level laser therapy (LLLT) has been described as a physical resource that is able to influence enzymes called metallopeptidases (MMPs) associated with extracellular matrix (ECM) turnover, thus accelerating neuromuscular recovery after nerve crush injuries. However, the effects of LLLT in the treatment of severe nerve injuries and denervated slow-twitch muscles are still inconclusive. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the effects of different wavelengths and energy densities of LLLT irradiation, applied to a severe nerve injury after reconstruction, on denervated slow-twitch skeletal muscle adaptation. **Method:** Rats were submitted to a neurotmesis of the sciatic nerve followed by end-to-end neurorrhaphy. They received transcutaneous LLLT irradiation at the lesion site. The LLLT parameters were: wavelengths - 660 or 780 nm; energy densities - 10, 60 or 120 J/cm^2; power - 40 mW; spot - 4 mm^2. Sciatic functional index (SFI), histological, morphometric, and zymographic analyses were performed. One-way ANOVA followed by Tukey's test was used ($p \leq 0.05$). **Results:** An atrophic pattern of muscle fibers was observed in all injured groups. The MMP activity in the soleus muscle reached normal levels. On the other hand, SFI remained below normality after PNI, indicating incapacity. No difference was found among PNI groups submitted or not to LLLT in any variable. **Conclusions:** LLLT applied to the nerve post-reconstruction was ineffective in delaying degenerative changes to the slow-twitch denervated muscles and in functional recovery in rats. New studies on recovery of denervated slow-twitch muscle are necessary to support clinical practice.

Keywords: neurological rehabilitation; nerve injury; laser therapy; skeletal muscle; physical therapy.

Resumo

Contextualização: A reabilitaçao das lesões nervosas periféricas (LNP) ainda é um desafio para a fisioterapia. A terapia com o laser de baixa potência (LBP) é descrita como um recurso físico capaz de interagir com enzimas relacionadas à alteração da matrix extracelular. Denominadas metalopeptidases (MMPs), essas enzimas atuam durante a recuperação neuromuscular após LNP. No entanto, os efeitos da LBP no tratamento de músculos desnervados de contração lenta após LNP graves ainda são inconclusivos. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de diferentes comprimentos de onda e densidades de energia de irradiação de LBP, aplicado sobre o local do nervo após LNP grave e reconstrução. **Método:** Ratos foram submetidos a neurotmese do nervo isquiático e neurorrafia término-terminal. Os parâmetros do laser são: comprimento de onda: 660 ou 780 nm; densidades de energia: 10, 60 ou 120 J/cm^2; potência: 40 mw; spot: 4 mm^2. O índice funcional isquiático (IFC) e análises histológicas, morfométricas e zimografia foram realizados. ANOVA one-way e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foram utilizados. **Resultados:** Um padrão atrófico das fibras musculares foi observado em todos os grupos com LNP. A atividade das MMPs no músculo sóleo alcançaram níveis normais. Entretanto, o IFC permaneceu inferior à normalidade após a LNP, indicando incapacidade. Não houve diferença entre os grupos de LNP submetidos ou não à LBP em qualquer variável. **Conclusão:** O LBP é incapaz de retardar alterações degenerativas em músculos sóleos desnervados e é ineficaz na recuperação funcional de ratos. Novos estudos sobre a recuperação do músculo de contração lenta desnervados são necessários para apoiar a prática clínica.

Palavras-chave: reabilitação neurológica; desnervação; laserterapia; músculo esquelético; fisioterapia.

Received: 01/30/2012 – **Revised:** 03/02/2012 – **Accepted:** 03/20/2012

Physical Therapy Department, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil
Correspondence to: Thiago Luiz de Russo, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, Departamento de Fisioterapia,Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil, e-mail: thiago_russo@yahoo.com.br

Introduction

Peripheral nerve injury (PNI) rehabilitation remains a challenge for physical therapists. This type of injury causes paralysis and causes profound degenerative alterations to skeletal muscle, leading to atrophy[1] and force deficits[2], thus impairing funcionality[3]. According to a Brazilian study, out of 456 cases analyzed, 41% of PNIs are neurotmesis[4]. In this type of PNI, there is nerve discontinuity as well as perineural disruption and in many cases loss of nerve tissue[5]. The patient is impaired both economically and socially in the occurrence of PNI, therefore post-operative treatment should aim for maximal restoration of patient functionality by stimulating neuronal growth and maintaining muscle trophism until reinnervation occurs.

The denervated skeletal muscle is a rich scenario of modifications that still has not been fully clarified. PNIs usually generate not only muscle fiber atrophy, but also incite alterations to the extracellular matrix (ECM) surrounding these fibers[6]. For example, denervated muscles have extensive endomysium and perimysium proliferation[4]. Often such proliferation can be associated with flexibility reduction, fibrosis, and deficits in the conduction of tension forces[7]. In this sense, ECM reorganisation is an important element to understanding the mechanisms of muscle adaptation in denervation.

MMPs are a zinc-dependent proteolytic enzyme family involved in the ECM remodeling process. They can be synthesized and secreted in the skeletal muscle by Schwann cells, satellite cells, and fibroblasts, specifically in the intramuscular nerves and the neuromuscular junction (NMJ)[8,9]. Among these enzymes, the MMP-2 (gelatinase A) and the MMP-9 (gelatinase B) are key to the ECM remodeling process in the skeletal muscle during changes in the intensity of physical activity or in cases of changes to task demands and to the process of injury repair[8].

These enzymes are known for acting on a non-fibrillar form of type IV collagen degradation and interstitial collagen hydrolysis[10]. The investigation concerning MMP activity is clinically relevant because MMPs act directly on collagen turnover and, therefore, on fibrosis formation, flexibility reduction, and mechanical force alterations in denervated muscles[7]. Furthermore, previous studies reported that MMPs can be involved in the reinnervation process of denervated muscle fibers[6,10] and probably allow axonal growth cones to advance into the muscle ECM.

In this context, the regulation of MMPs in denervated muscles has great importance to clinical practice. Understanding how the resources normally used by the rehabilitation team can affect MMP activation can provide a scientific basis for its use in humans. Among the possible candidates that promote neuromuscular recovery in PNI is low-level laser therapy (LLLT).

Recently, it was demonstrated that LLLT accelerates muscle fiber cross-section area (CSA) recovery in denervated fast-twitch muscles of rats when LLLT is applied to crushed nerves[3]. These authors concluded that LLLT irradiation accelerated neuromuscular recovery by increasing MMP-2 activation in the injured nerve and inhibiting the activation of MMP-9 and -2 in injured nerves and denervated muscles, respectively. These changes in MMP activation were also associated with walking recovery[3]. This study has brought subsidies for future indications of LLLT use in humans. However, studies are needed on slow-twitch muscle adaptation during severe nerve injuries.

The objective of this study was to evaluate the response of a denervated slow-twitch skeletal muscle (soleus) to LLLT irradiation applied to an injured nerve. A severe nerve injury model (neurotmesis), followed by end-to-end neurorrhaphy reconstruction, was used in the present study in an attempt to mimic clinical situations. Furthermore, special attention was given to the selection of irradiation parameters, muscle function and trophism, and ECM adaptation in denervated muscles. This work is relevant to neurological rehabilitation because it considers a common situation in physical therapy practice. Moreover, the use of the animal model in this study is justified due to ethical reasons surrounding the biopsy of denervated muscles in humans. Finally, the hypothesis of this study was that LLLT irradiation in injured-reconstructed nerves is able to accelerate nerve recovery and muscle reinnervation, improving function and reestablishing soleus muscle trophism via the regulation of MMP activity.

Method

Animal care and experimental groups – Sixty-four male 3-month-old Wistar rats (275 g) were used. The animals were housed in plastic cages in a room with controlled environmental conditions and free access to water and standard food. The Ethics Committee of Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil, approved the experimental procedures (Process 001/06), and the study was conducted in accordance with the national guide for care and use of laboratory animals.

Experimental groups

The animals were randomly divided into eight groups (n=8): (1) normal (N) in which the animals received no intervention and remained free in the cage for 84 days; (2) transected nerve and end-to-end neurorrhaphy (TT) with simulation treatment (placebo) for one minute; (3) transected nerve and end-to-end

neurorrhaphy irradiated with LLLT 660 nm 10 J/cm^2 (TT660 10); (4) transected nerve and end-to-end neurorrhaphy irradiated with LLLT 660 nm 60 J/cm^2 (TT660 60); (5) transected nerve and end-to-end neurorrhaphy irradiated with LLLT 660 nm 120 J/cm^2 (TT660 120); (6) transected nerve and end-to-end neurorrhaphy irradiated with LLLT 780 nm 10 J/cm^2 (TT780 10); (7) transected nerve and end-to-end neurorrhaphy irradiated with LLLT 780 nm 60 J/cm^2 (TT780 60); (8) transected nerve and end-to-end neurorrhaphy irradiated with LLLT 780 nm 120 J/cm^2 (TT780 120).

Surgery procedure

The animals were anesthetised with an intraperitoneal injection of a premixed solution containing ketamine (95 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). The skin was shaved and cleaned with 10% povidone iodine. A 2-cm-long incision was made on the skin through a gluteal approach and the left sciatic nerve was exposed. The sciatic nerve was cut and sutured with a nylon monofilament 8.0 in the epineural region only. This microsurgical procedure was performed by visualization of a surgical magnifying lens with 4x magnification. The nerves were kept moist with 37ºC sterile saline solution throughout the surgical intervention. After surgery[11,12], the animals were housed in single cages and fed rat chow and water ad libitum. For the first four days, acetaminophen (13.5 mg/100 mL) was added to the water for pain reduction. A single dose of the antibiotic Terramycin (1 mg/0.1 mL) was administered to prevent secondary complications related to possible infections.

LLLT protocol and experimental design

Biostimulation was carried out using a gallium–aluminum–arsenide laser device (TWIN LASER, MM Optics, São Carlos, SP, Brazil) with the following parameters: continuous radiation, wavelength: 660 or 780 nm, power: 40 mW, spot area: 4 mm^2, energy density at the point of entry: 10, 60 or 120 J/cm^2. The time of stimulation was predetermined by the device following the abovementioned parameters. All parameters were obtained from Gigo-Benato et al.[3] and are described in detail in Table 1. Calibration was performed by MM Optics (São Carlos, SP, Brazil). Briefly, a calibrated powermeter was used to verify the power of the laser device. This verification was approved only if the deviation was not higher than 20% of mean value.

Radiation was applied transcutaneously after shaving the skin over the site of the surgery (recognizable for the presence of the surgical scar) at two points along the sciatic nerve, one above and one below the scar site, and two centimetres apart. Applications were made daily for 10 consecutive days beginning on the first day after surgery and on alternative days for another month. The animals were handled with care. Laser biostimulation did not cause any pain or distress to the animals, therefore it was not necessary to use anesthesia.

Assessment of nerve function recovery

The assessment of nerve function recovery was carried out by calculating the sciatic functional index (SFI) as described by Bain, Mackinnon and Hunter[13]. Animals were tested in a confined walkway 42 cm long and 8.2 cm wide, with a dark shelter at the end. A white sheet of paper was placed on the floor of the rat walkway. The rats' hind paws were pressed down onto a finger paint-soaked sponge, and they were then allowed to walk down the walkway leaving their hind footprints on the paper. Three measurements were taken from the footprints: (1) the print length (PL), i.e. the distance from the heel to the third toe; (2) the toe spread (TS), i.e. distance from the first to the fifth toe; and (3) the intermediate toe spread (ITS), i.e. distance from the second to the fourth toe. All three measurements were taken from the experimental (E) and normal (N) sides. The SFI was calculated according to the following equation[14]:

$$SFI = -38.3[(EPL-NPL)/NPL]+109.5[(ETS-NTS)/NTS]+13.3[(EITS-NITS)/NITS]-8.8$$

Muscle evaluation

The right soleus muscles were carefully dissected to avoid mechanical injuries. The muscles were then divided in half at the middle of the belly. The proximal fragment was used for the histological and morphometric measurements. The distal fragment was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (Forma Scientific, Marietta, OH) for the zymographic analysis.

Afterwards, the proximal fragment was frozen in isopentane, previously frozen in liquid nitrogen. Muscle samples were placed in plastic tubes and stored at -80°C. Histological serial cross-sections (10 μm), cut transversely to the muscle main axis, were obtained with a HM 505E cryostat (Microm, Walldorf, Germany) at a level corresponding to the middle belly of the muscle. Muscle sections were stained with 1% toluidine blue/1% borax. Pictures from five different regions were obtained using a light microscope (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a digital camera (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Germany). From each picture, the CSA of 70 randomly chosen fibers was measured using the software Axiovision 3.0.6 SP4 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Table 1. Parameters of LLLT application in different experimental groups.

Experimental Groups n=8	Wavelength (nm)	Power (mW)	Energy density (J/cm²)	Total energy emitted per point (J)*	Time ON (s)
N	-	-	-	-	-
TT	Simulated	Simulated	Simulated	Simulated	60
TT660 10	660	40	10	1.2	30
TT660 60	660	40	60	2.4	60
TT660 120	660	40	120	4.8	120
TT780 10	780	40	10	1.2	30
TT780 60	780	40	60	2.4	60
TT780 120	780	40	120	4.8	120

*Total energy for point (J) = Power (W) x Time on (s).

Zymography

Tissue extraction and zymographic analysis was performed according to current methodology[15,16]. The molecular mass of gelatinolytic activities was determined by comparison to reference protein molecular mass marker PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada). Activity bands were identified following a previous description[17], according to their molecular weights (pro-MMP-2: 72 kDa; intermediate-MMP-2: 64 kDa; and active-MMP-2: 57 kDa and pro- MMP-9: 92 kDa; intermediate-MMP-9: kDa; active-MMP-9: 81 kDa). Densitometric quantitative analysis of the protein bands in the zymography was performed using the software GeneTools v3.06 (Syngene, Cambridge, UK).

Statistical analysis

The Shapiro–Wilk test and Levene's test were applied to evaluate the normality and homogeneity of the results, respectively. Repeated measures ANOVA was performed for the SFI. For the muscle-fiber cross-sectional area and the MMP activity variables, one-way ANOVA was used to identify possible differences among groups. When differences were observed, Tukey's test was performed. For all tests, the significance level was set at 5% ($p \leq 0.05$).

Results

Sciatic functional index (SFI)

The pre-neurotmesis (pre-TT) SFI values were considered normal (-7.44). No difference was found among the experimental groups in the pre-TT moment ($p>0.05$; Figure 1). As expected, on the first day after injury there was a reduction in the SFI compared with pre-TT in all injured groups ($p>0.05$; Figure 1). On the last day (84th day), a partial functional recovery was observed in all injured groups when compared to day 1 ($p<0.05$; Figure 1). Nevertheless, these values remained inferior to those values observed in the normal group ($p<0.05$; Figure 1), with no difference among injured groups on day 84 post-injury ($p>0.05$; Figure 1). No difference was detected among the groups at any point between the first and the last day (data not shown).

Muscle morphology and cross-sectional area (CSA)

The muscle morphology analysis showed an atrophic pattern of muscle fibers for all injured groups (LLLT irradiated or not) when compared to the normal group (Figure 2). Connective tissue proliferation was observed in the denervated soleus muscles (Figure 2B-G), specially surrounding the muscle fibers (endomysium) and fiber bundles (perimysium) compared to Normal group (Figure 2A).

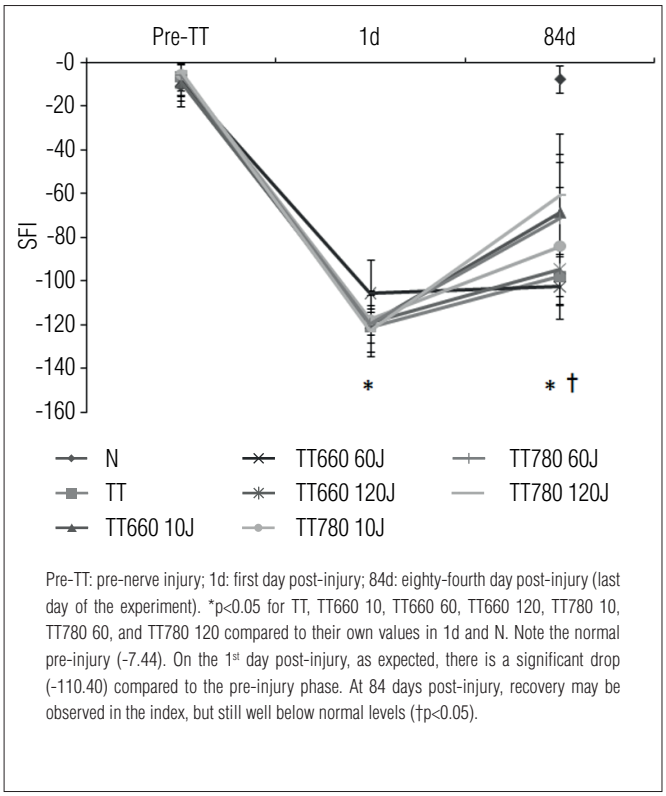
Moreover, angulated and degenerated fibers were observed in all denervated groups (Figure 2B-G). These characteristics are a direct indication of skeletal muscle modifications caused by the absence of innervation. In these groups, central nuclei were also observed, confirming the myopathic phenotype (Figure 2I).

Muscle fiber atrophy was confirmed by muscle fiber CSA measurement. All denervated groups showed smaller muscle fiber CSA than normal ($p<0.05$; Figure 3; TT: -69.2%, TT660 10: -61.5%; TT660 60: -46.1%; TT660 120: -64.1%; TT780 10: -51.3%; TT780 60: -53.8% and TT780 120: -52.6%). No difference was observed among denervated groups ($p>0.05$; Figure 3).

MMP activity in denervated soleus muscle

The MMP-9 activity was not detected in any samples of the soleus muscle. In comparison, three MMP-2 isoforms were located (pro, intermediate, and active) in all groups. A representative gel is shown in Figure 4A.

Densitometric analysis showed no difference among denervated and normal groups in any of the isoforms ($p>0.05$; Figure 4B-D).



Pre-TT: pre-nerve injury; 1d: first day post-injury; 84d: eighty-fourth day post-injury (last day of the experiment). *p<0.05 for TT, TT660 10, TT660 60, TT660 120, TT780 10, TT780 60, and TT780 120 compared to their own values in 1d and N. Note the normal pre-injury (-7.44). On the 1st day post-injury, as expected, there is a significant drop (-110.40) compared to the pre-injury phase. At 84 days post-injury, recovery may be observed in the index, but still well below normal levels (†p<0.05).

Figure 1. Sciatic functional index (SFI) in different experimental groups.

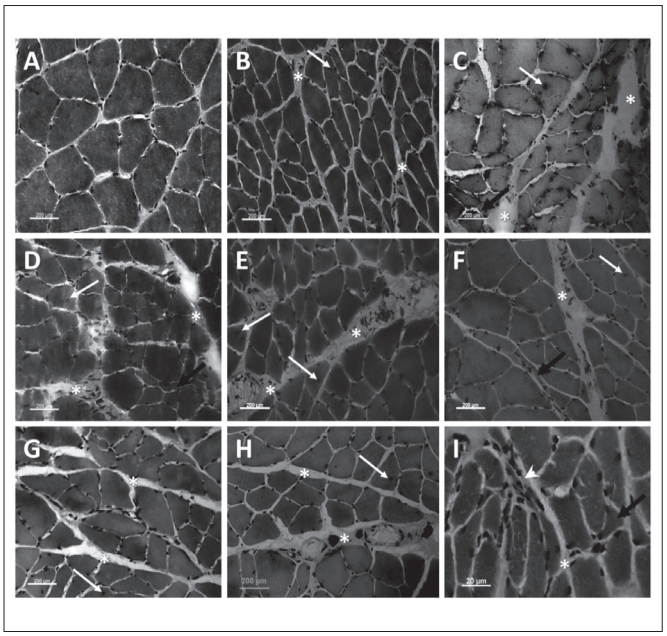


Figure 2. Soleus muscle cross-section of the different experimental groups stained with toluidine blue: A) N; B) TT; C) TT660 10; D) TT660 60; E) TT660 120; F) TT780 10; G) TT780 60; H) TT780 120; and I) TT660 120. White arrows indicate muscle fibers with centralized nuclei; black arrows indicate the angled fibers; asterisks indicate proliferation of connective tissue; and arrow heads indicate the degenerating fibers.

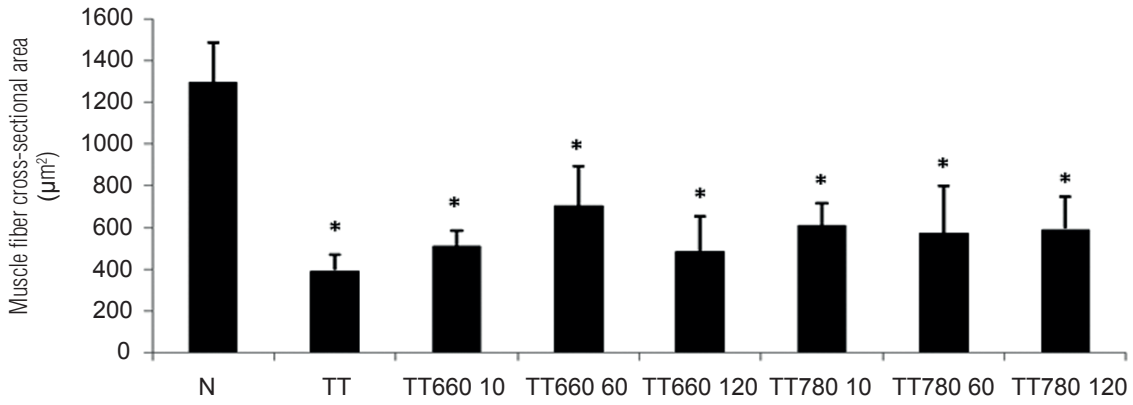
Discussion

The present study demonstrated that LLLT applied to reconstructed nerve with the parameters investigated here is unable to avoid degenerative modifications to denervated slow-twitch muscles and ineffective in recovering functionality in rats. The present results did not corroborate the findings observed in denervated fast-twitch muscles whose crushed nerves were irradiated with LLLT[3].

Recently, Gigo-Benato et al.[3] pointed out that LLLT irradiation of crushed sciatic nerves caused acceleration in nerve regeneration and contributed toward CSA recovery in the tibialis anterior (TA) muscles of rats. They also demonstrated that a wavelength of 660 nm, with energy densities of 10, 60, and 120 J/cm^2, was effective in increasing the MMP-2 activity of the injured nerves, possibly facilitating axonal growth through laminin, fibronectin, and type IV collagen degradation[18]. In addition, LLLT decreased the MMP-9 activity of these nerves, which probably helped to attenuate the inflammatory process. Finally, they demonstrated a decrease in MMP-2 activity in the TA muscles of the crushed groups irradiated with 660 nm LLLT. The factors that hinder a direct comparison between this and the present study are the differences between the experimental models, namely, the crushing model compared to the nerve section model and the different investigation times.

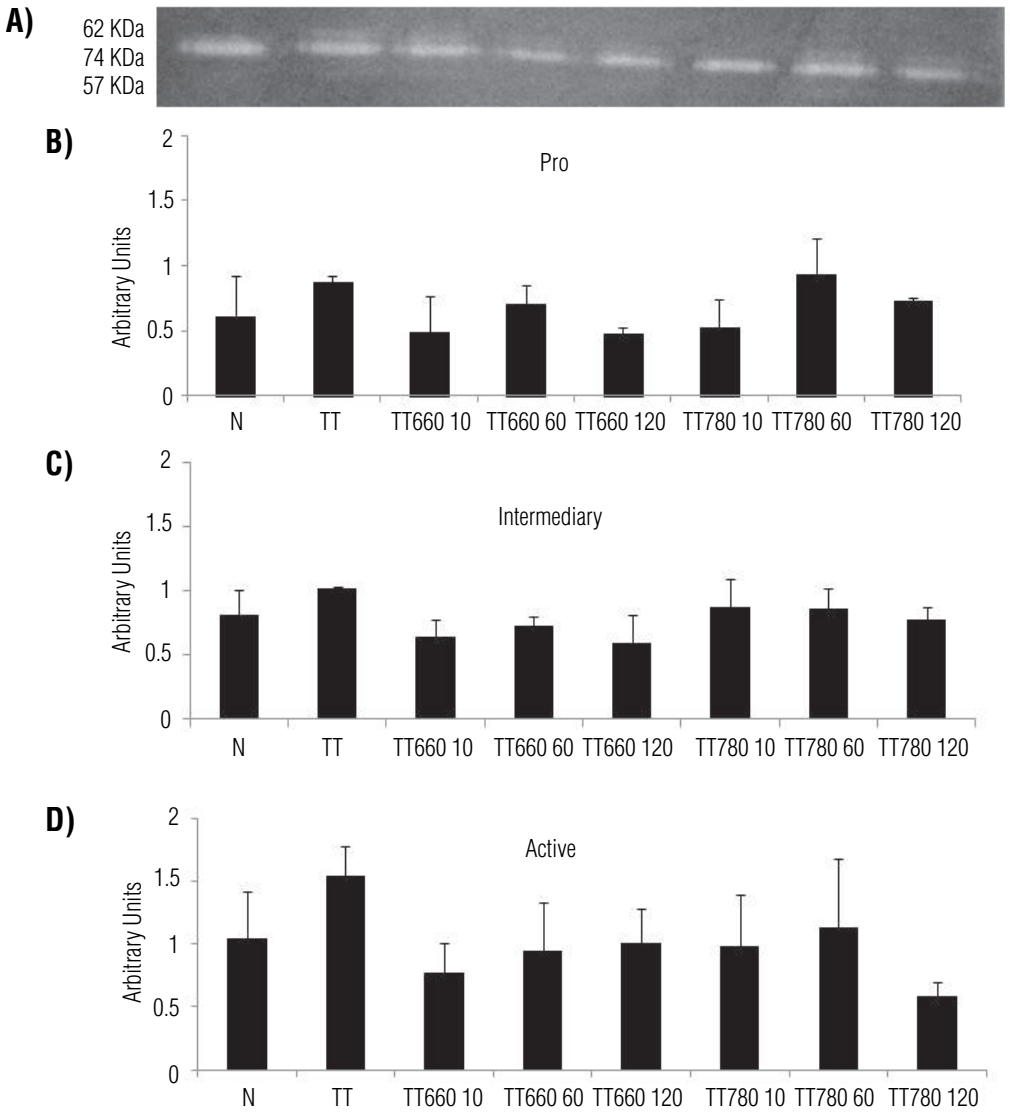
Another factor that may have influenced the findings related to muscle trophism is fiber composition. Gigo-Benato et al.[3] investigated fast-twitch muscles (TA) composed mainly of type II fibers. However, the present study focused on a slow-twitch muscle (soleus) composed mainly of type I fibers[19]. It has been well described in the literature that slow-twitch muscles exert antigravity function[20] and respond more to immobilization and disuse situations if compared to fast-twitch muscles. Furthermore, the reduction in oxidative capacity, and the increase in glycolytic metabolism in denervated slow-twitch muscles combined with muscle fiber phenotype transition (from type I to type II) can also interfere with muscular adaptative response[19,21].

Another difference between these studies lies in the fact that: first, slow-twitch muscle fibers are innervated by small motoneurons and fast-twitch muscle fibers are innervated by larger motoneurons[22-25]; and second, that after a nerve injury, Wallerian degeneration occurs from the proximal stump towards the distal followed by neuronal growth cone advance[5]. Thus, a hypothesis generated for the present study is that LLLT could selectively stimulate the neuronal growth cones of large motor units. This hypothesis can be corroborated by two other facts: 1) large motoneuronal growth cones have more mitochondria than those of small motoneurons[5]; and 2) there is evidence that LLLT can act selectively on oxidative metabolism by activating the mitochondrial respiratory chain[26]. LLLT acts



*p<0.05 compared to N. Note the decrease in CSA in all groups compared to denervated N. There was no difference between the TT groups irradiated or not with LLLT.

Figure 3. Cross-sectional area (CSA) of soleus muscles from the different experimental groups.



The bands representing MMP-2 gelatinase activity are shown at the top of figure (A). Activity isoforms pro (B), intermediate (C), and active (D). MMP-2 observed in different experimental groups. All experimental groups demonstrated similar values to group N (p>0.05).

Figure 4. MMP-2 activity in denervated soleus muscle.

on cellular metabolism increasing the size and amount of mitochondria, and oxygen consumption[27,28]. Thus, we believe that LLLT could stimulate the mitochondria of large motor units, facilitating growth cone advance. However, future studies must be performed to test this hypothesis.

Regarding MMP-2 activity, normal levels were found in all denervated soleus muscles. This can be attributed to timing. Demestre et al.[6] reported an increase in MMP-2 activity in denervated soleus muscles 20 and 40 days after crush nerve injury and a return to normal levels 63 and 72 days after injury, in accordance with the present study. Thus when comparing two types of injury, it is possible to reach the conclusion that MMP activity is normal in later phases of post-neurotmesis recovery.

In contrast, these normal levels of MMP-2 activity could be related to a state of balance that atrophic muscles can reach. Recent studies reported that other degradation pathways, i.e. autophagic pathway, can be involved in late denervated muscle atrophy. In addition, skeletal muscles have strategies to inhibit these pathways and preserve myofibrillar organization, such as the increase in Runx1 (Runt-related transcription factor 1) expression[29]. The present study corroborates this finding because the muscle fiber analysis of the denervated groups showed many signs of injury-regeneration cycles, such as central nucleus and fiber fragmentation. Angled fibers were also observed in all denervated groups, showing a homogeneous pattern in these muscles.

Considering functional recovery, it should be observed that the injury model used in the present study is slower than crush models, with worse prognosis and longer recovery. De Sá et al.[30] demonstrated that 80% of nerve function was recovered within 60 days of end-to-end neurorrhaphy. The authors suggested that in a few more weeks the repairing process could be complete. Hence, when evaluating the period of 84 days post-injury, we observed a significant, albeit incomplete, functional improvement in all injured groups (LLLT irradiated or not). New studies should investigate longer times after injury in order to determine the moment of total functional recovery.

It is also worth noting that the present study carried out a dose-response curve following recommendations of clinical protocols of LLLT application. For the wavelength, some studies demonstrated that either visible[31-33] or near-infrared lasers[34] are able to stimulate neuronal growth. Energy density is another important parameter to be considered when investigating LLLT effects. Analysis of published results showed that LLLT at different levels of energy density (ranging from <10 to 150 J/cm^2) are effective in promoting nerve regeneration. The same is observed for time of irradiation which varies from <1 min to 90 min. But despite the evidence that light can affect nerve recovery, the literature is still unclear on the best combination of parameters to improve the regenerative process. Finally, all published studies that reported good results in nerve regeneration used continuous LLLT[33,35,36]. The present study followed all of these recommendations.

The results of the present study have significant clinical considerations. Based on our findings, therapists should keep in mind that denervated slow-twitch muscles do not recover as quickly as fast-twitch muscles[3]. Future studies should focus on interventions not only for the injured nerve, but also for the denervated muscle. Muscle stretching, electrical stimulation, and LLLT have already shown significant results in PNI treatment[37-40], thus, they should also be considered in future studies for the recovery of denervated slow-twitch muscles.

The present study has some limitations that should be considered. A time-course curve to verify cellular and molecular modifications could provide information about the MMP activity pattern over time and possible correlations with morphological findings. Furthermore, a comparison between fast- and slow-twitch muscles is necessary to investigate the differences in the reinnervation process and MMP content/activity according to muscle type. Although the present study focused on muscle investigation, other studies should consider the evaluation of morphological and molecular nerve aspects to provide evidence of interaction between LLLT and peripheral nerves.

In conclusion, using a severe PNI standardized model and an LLLT protocol based on literature recommendations, we found that LLLT applied to injured nerves, regardless of the dose, was ineffective in accelerating functional recovery and improving denervated slow-twitch muscle trophism in rats.

Acknowledgements

The Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil (Process number: 2010/11795-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasilia, DF, Brazil, for financial support.

References

1. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Gigo-Benato D, Delfino GB, Salvini TF. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. J Muscle Res Cell Motil. 2010;31(1):45-57.
2. Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. Muscle Nerve. 2004;30(1):77-86.
3. Gigo-Benato D, Russo TL, Tanaka EH, Assis L, Salvini TF, Parizotto NA. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. Lasers Surg Med. 2010;42(9):673-82.
4. Kouyoumdjian JA. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. Muscle Nerve. 2006;34(6):785-8.
5. Sunderland S. Nerves and nerve injuries. 2ª ed. London: Churchill Livingston; 2002.
6. Demestre M, Orth M, Wells GM, Gearing AJ, Hughes RAC, Gregson NA. Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. Neuropathol Appl Neurobiol. 2005;31(5): 545-55.
7. Smith AST, Shah R, Hunt NP, Lewis MP. The role of connective tissue and extracellular matrix signaling in controlling muscle development, function, and response to mechanical forces. Semin Orthod. 2010;16(2):135-42.
8. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. Muscle Nerve. 2004;29(2):191-7.
9. Kherif S, Dehaupas M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. Neuropathol Appl Neurobiol. 1998;24(4):309-19.
10. Ahtikoski AM, Tuominen H, Korpelainen JT, Takala TE, Oikarinen A. Collagen synthesis and degradation in polyneuropathy and myopathies. Muscle Nerve. 2004;30(5):602-8.
11. Dvali L, Mackinnon S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. Clin Plast Surg. 2003;30(2):203-21.
12. Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve suturing and postoperative low-power laser treatment. J Reconstr Microsurg. 2001;17(2):133-7.
13. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstr Surg. 1989;83(1):129-38.
14. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, et al. Functional and morphological assessment standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. J Neurotrauma. 2004;21(11):1652-70.
15. Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SE, Selistre-de-Araújo HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. Am J Sports Med. 2006;34(8):1274-80.
16. Peviani SM, Russo TL, Durigan JL, Vieira BS, Pinheiro CM, Galassi MS, et al. Stretching and electrical stimulation regulate the metalloproteinase-2 in rat denervated skeletal muscle. Neurol Res. 2010;32(8):891-6.
17. Carvalho RF, Dariolli R, Justulin Junior LA, Sugizaki MM, Politi Okoshi M, Cicogna AC, et al. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. Int J Exp Pathol. 2006;87(6):437-43.
18. La Fleur M, Underwood JL, Rappolee DA, Werb Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. J Exp Med. 1996;184(6):2311-26.
19. Lieber RL, Fridén JO, Hargens AR, Feringa ER. Long-term effects of spinal cord transection of fast and slow rat skeletal muscle. II. Morphometric properties. Exp Neurol. 1986;91(3):435-48.
20. Zimowska M, Brzoska E, Swierczynska M, Wstreminska W, Moraczewski J. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. Int J Dev Biol. 2008;52(2-3):307-14.
21. Zhou, Z, Cornelius CP, Eichner M, Bornemann A. Reinnervation-induced alterations in rat skeletal muscle. Neurobiol Dis. 2006;23(3):595-602.
22. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
23. Lundborg G, Dahlin LB. Anatomy, function, and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression. Hand Clin. 1996;12(2):185-93.
24. Miyauchi A, Kanje M, Danielsen N, Dahlin LB. Role of macrophages in the stimulation and regeneration of sensory nerves by transposed granulation tissue and temporal aspects of the response. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg. 1997;31(1):17-23.
25. Heumann R, Hengerer B, Brown M, Perry H. Molecular mechanisms leading to lesion-induced increases in nerve growth factor synthesis. Ann N Y Acad Sci. 1991;633:581-2.
26. Karu TI. Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation on cells. J Photochem Photobiol B. 1999;49(1):1-17.
27. Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Corrêa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. Lasers Surg Med. 2006;38(7):704-13.
28. Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. Free Radic Biol Med. 2007;43(1): 128-35.
29. Wang X, Blagden C, Fan J, Nowak SJ, Taniuchi I, Littman DR, et al. Runx1 prevents wasting, myofibrillar disorganization, and autophagy of skeletal muscle. Genes Dev. 2005;19(14): 1715-22.
30. De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair. Functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. J Neurosci Methods. 2004;136(1):45-53.
31. Rochkind S, Rousso M, Nissan M, Villarreal M, Barr-Nea L, Rees DG. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. Lasers Surg Med. 1989;9(2):174-82.
32. Hamilton GF, Robinson TK, Ray RH. The effects of helium-neon laser upon regeneration of the crushed peroneal nerve. J Orthop Sports Phys Ther. 1992;15(5):209-14.
33. Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. Neurol Res. 2004;26(2):233-9.
34. Rochkind S, El-Ani D, Nevo Z, Shahar A. Increase of neuronal sprouting and migration using 780nm laser phototherapy as procedure for cell therapy. Lasers Surg Med. 2009;41(4): 277-81.
35. Gigo-Benato D, Geuna S, de Castro Rodrigues A, Tos P, Fornaro M, Boux E, et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. Lasers Med Sci. 2004;19(1):57-65.
36. Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. Int Rev Neurobiol. 2009;87:445-64.
37. Fernandes KCBG, Polacow MLO, Guirro RRJ, Campos GER, Somazz MC, Pinto VF, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. Rev Bras Fisioter. 2005;9(2):235-41.
38. Reis FA, Belchior ACG, Nicolau RA, Fonseca TS, Carvalho PTC. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (660Nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmese seguida de anastomose epineural: análise funcional. Rev Bras Fisioter. 2008;12(3):215-21.
39. Caierão QM, Betini J, Teodori RM, Minamoto VB. O efeito do intervalo da estimulação elétrica no músculo desnervado de rato. Rev Bras Fisioter. 2008;12(2):143-8.
40. Teodori RM, Silva AM, Silva MT, Oliveira LS, Polacow MLO, Guirro ECO. High-voltage electrical stimulation improves nerve regeneration after sciatic crush injury. Rev Bras Fisioter. 2011;15(4):325-31.

ANEXO IV

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676
CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil
Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUF - BR
cephumanos@power.ufscar.br http://www.propq.ufscar.br

Parecer Nº. 278/2011

Título do projeto: CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE IGF-1 E IGFBP-3 COM O DESEMPENHO E O VOLUME MUSCULAR EM INDIVÍDUOS HEMIPARÉTICOS CRÔNICOS
Área de conhecimento: 4.00 - Ciências da Saúde / 4.08 - Fisioterapia e Terapia Ocupacional
Pesquisador Responsável: MARCELA DE ABREU SILVA
Orientador: THIAGO LUIZ DE RUSSO
Colaborador(es): TANIA DE FATIMA SALVINI
CAAE: 0067.0.135.000-11 **Processo número:** 23112.001166/2011-74 **Grupo:** III

Análise da Folha de Rosto
A Folha de Rosto está completamente preenchida e devidamente assinada.

Descrição sucinta dos objetivos e justificativas
Objetivo geral
Avaliar o volume e o desempenho dos músculos extensores do joelho e correlacioná-los aos níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3 em indivíduos hemiparéticos crônicos e saudáveis.

Objetivos específicos
Correlacionar as variáveis de torque e potência muscular dos músculos extensores de joelho, obtidos em avaliação isocinética, funcionalidade de membros inferiores, volume muscular obtido por RNM, com os níveis séricos de IGF-1 e de IGFBP-3 em indivíduos hemiparéticos crônicos e saudáveis.
Apesar dos níveis de IGF-1 e IGFBP-3 terem sido investigados em várias populações, nenhum estudo avaliou tais níveis em indivíduos hemiparéticos. Em resumo, podemos concluir que IGF-1 e IGFP-3 são biomarcadores que executam uma boa correlação com as variáveis relacionadas ao desempenho muscular e que trarão respostas esclarecedoras quanto aos mecanismos moleculares de controle da massa muscular em indivíduos hemiparéticos crônicos.
Desta forma, a hipótese do presente estudo é que os indivíduos hemiparéticos crônicos apresentarão diminuição do volume e desempenho musculares relacionados à redução dos níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3 quando comparados a indivíduos saudáveis.

Metodologia aplicada
O estudo será realizado através de protocolos de avaliação clínica, de avaliação em dinamômetro isocinético, de avaliação por eletromiografia e de avaliação da função motora, além de análises de níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3. Farão parte do estudo 26 sujeitos, divididos em dois grupos denominados grupo hemiparético e grupo controle. O grupo hemiparético terá 13 sujeitos com hemiparesia crônica decorrente de AVE unilateral, de origem isquêmica ou hemorrágica, de quaisquer hemisférios, podendo ser de ambos os gêneros. Serão incluídos no grupo controle 13 sujeitos saudáveis, que apresentarem idade e gênero pareados com o grupo hemiparético

Identificação de riscos e benefícios
Os autores relatam que a pesquisa oferece baixo risco aos participantes e descrevem alguns cuidados para não tornar estes riscos reais. "As avaliações só serão realizados mediante ao resultado positivo do exame de aptidão física realizado por um médico e a condição suficiente de independência e funcionalidade avaliados por fisioterapeuta. A Ressonância Nuclear Magnética só será realizada na ausência de prótese metálica ou marca-passo cardíaco. No caso de pacientes de gênero feminino, se estiver grávida ou amamentando não realizará este exame. O paciente será cuidadosamente monitorado quanto a freqüência cardíaca e a pressão arterial. Caso algum procedimento promova dor ou desestabilização dos sinais vitais (hipertensão arterial e batimentos cardíacos) será interrompido. Se necessário será encaminhado para uma unidade de saúde mais próxima."
Relatam os benefícios: "Dentre os benefícios que este estudo promove o acesso a avaliação minuciosa e de alto custo e tecnologia. Será oferecido material educativo com objetivo de promover alterações na qualidade de vida através de incentivo à prevenção do AVE. Serão oferecidas orientações realizadas referentes ao cuidado do paciente neurológico."

Forma de recrutamento
Os sujeitos hemiparéticos serão recrutados da Unidade Saúde Escola (USE/UFSCar) e da comunidade local através de divulgações realizadas em veículos de comunicação como rádio, cartazes e panfletos.

Critérios de inclusão
Serão incluídos no estudo os sujeitos que apresentarem ocorrência do último episódio de AVE há mais de 6 meses (BAYS, 2001), sem mudanças documentadas no comprometimento motor ou sensorial, tônus muscular ou atividade reflexa nos 3 meses prévios à participação do sujeito no estudo. A faixa etária estará compreendida entre 40 e 70 anos. Será realizada análise por faixa etária a cada 10 anos.

Critérios de exclusão
Serão excluídos do estudo quaisquer sujeitos (hemiparéticos e controle) que apresentem: doenças cardiovasculares graves (insuficiência cardíaca, arritmias ou angina pectoris); doenças reumatológicas; hepato-patologias; diagnóstico de câncer; reposição hormonal ou terapias medicamentosas que alterem a regulação de níveis de IGF-1 ou a sua resposta no músculo esquelético; pacientes que não possam doar sangue e que apresentem alguma alteração na coagulação sanguínea; índice de massa corporal (IMC) maior que 28 kg/m² alterando a confiabilidade dos dados de EMG; outras doenças ortopédicas ou neurológicas que comprometam a coleta de dados por meio do teste isocinético e deficiências cognitivas ou de comunicação que impossibilitem a realização dos procedimentos. Indivíduos com antecedentes de lesão no joelho ou nos músculos dos membros inferiores também serão excluídos. A presença de dor durante os procedimentos será considerada critério de exclusão.

Cronograma
O cronograma parece adequado para a realização da pesquisa.

Orçamento financeiro detalhado
Os 39 exames de imagem do tipo ressonancia magnética, o material de consumo kits de processamento para a análise dos níveis séricos e o auxílio para tranporte dos pacientes sarão custiados pela FAPESP, verba do pesquisador coordenador do projeto (orientador). O aluno responsável pelo projeto possui a bolsa institucional da agencia CNPq.

Adequação do TCLE
Adequado.

Identificação dos currículos dos participantes da pesquisa
Os currículos dos participantes são adequados para a realização da pesquisa.

Comentários
Trata-se de uma pesquisa que considera os aspectos da Resolução 196/96 em relação ao desenvolvimento de pesquisa com seres humanos.

Conclusão
O projeto atende a Resolução 196/96. **Aprovado.**

Normas a serem seguidas:
• O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
• O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

• O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

• Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).

• Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente dentro de 1 (um) ano a partir desta dada e ao término do estudo.

São Carlos, 11 de maio de 2011.

Prof. Dr. Daniel Vendruscolo
Coordenador do CEP/UFSCar