

Ações da LED terapia na imobilização muscular

Actions of LED therapy in muscle immobilization

Acciones de LED therapy en la inmovilización muscular

Marco Aurélio Serafim Bonvino^{1*}, Carlos Alberto da Silva².

RESUMO

Objetivo: Analisar em ratos o efeito da LED terapia em músculos submetidos a imobilização. **Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar de 2 meses de idade nos grupos experimentais: Controle (C), Imobilizados com órtese de resina acrílica (I; 7 dias), Controle tratados com LED (LED; 7 dias de aplicação; 630nm; 500 mW; 8-10 J/cm² equivalente a 30-40s) e imobilizados tratados com LED (ILED; n=6 grupo). Avaliações realizadas: teste de tração (com foco no gastrocnêmio, n=4/grupo), conteúdo muscular de glicogênio (GLI) e relação proteína total/DNA (PT/DNA) dos músculos sóleo e gastrocnêmio. **Resultados:** Mostraram que o grupo LED não diferiu do C quanto as GLI, PT/DNA nem as respostas frente ao teste de tração. Os músculos do grupo I resistiram menos a tração e ainda apresentaram menores GLI e PT/DNA indicando atrofia, por sua vez, no grupo ILED as condições GLI e PT/DNA foram significativamente melhores se comparado ao I e ainda apresentaram maior resistência no teste de tração se comparado ao I não tratado. **Conclusão:** A LED terapia propiciou melhores condições energéticas e possivelmente estruturais, minimizando eventos da imobilização.

Palavras-chave: Imobilização, Músculo esquelético, Fisioterapia.

ABSTRACT

Objective: To analyze the effect of LED therapy on muscles subjected to immobilization in rats. **Method:** Two-month old Wistar rats were used in the experimental groups: Control (C), Immobilized with acrylic resin bracing (I; 7 days), Control treated with LED (7 days of application, 630nm, 500 mW; 8-10 J / cm² equivalent to 30-40s) and LED treated immobilized (ILED; n = 6 group). (GI) and total protein / DNA ratio (PT / DNA) of the soleus and gastrocnemius muscles. **Results:** Showed that the LED group did not differ from C as GLI, PT / DNA nor the responses to the traction test. The muscles of group I were less resistant to traction and still showed lower GLI and PT / DNA indicating atrophy. In turn, in the ILED group, GLI and PT / DNA conditions were significantly better when compared to I and still showed higher resistance in the test. traction compared to I have not treated. **Conclusion:** LED therapy provided better energetic and possibly structural conditions, minimizing immobilization events.

Key words: Immobilization, Skeletal muscle, Physiotherapy.

RESUMEN

Objetivo: Analizar en ratones el efecto de la LED terapia en músculos sometidos a inmovilización. **Método:** Se utilizaron ratones Wistar de 2 meses de edad en los grupos experimentales: Control (C), Inmovilizados con ortesis de resina acrílica (I, 7 días), Control tratados con LED (LED, 7 días de aplicación, 630nm, 500

¹Doutorando no Programa de Pós-graduação em Ciências do Movimento Humano, UNIMEP – Piracicaba-SP.

*E-mail: marcoareliofisio@yahoo.com.br

²Professor no Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, Campinas-SP.

mW, 8- 10 J / cm² equivalente a 30-40) e imobilizados tratados com LED (ILED, n = 6 grupo). Las evaluaciones realizadas: ensayo de tracción (centrado en el gastrocnemio, n = 4 / grupo), el contenido de glucógeno muscular (GLI) y la proporción de proteína / ADN total (PT / ADN) de los músculos sóleo y gastrocnemio. **Resultados:** Mostraron que el grupo LED no difería del C como las GLI, PT / ADN ni las respuestas frente a la prueba de tracción. Los músculos del grupo I resistieron menos la tracción y aún presentaron menores GLI y PT / ADN indicando atrofia, a su vez, en el grupo ILED las condiciones GLI y PT / ADN fueron significativamente mejores en comparación con el I y aún presentaron mayor resistencia en la prueba de en comparación con el I no tratado. **Conclusión:** La LEDterapia propició mejores condiciones energéticas y posiblemente estructurales, minimizando eventos de la inmovilización.

Palabras clave: Inmovilización, Músculo esquelético, Fisioterapia.

INTRODUÇÃO

A atrofia do músculo esquelético, gerada pelo desuso, se caracteriza pela redução na massa muscular em decorrência de expressivas mudanças fisiológicas e morfológicas, neste sentido, entender os mecanismos envolvidos neste processo é importante para desenvolver protocolos que minimizem tais alterações e/ou auxiliem na preservação de funções fisiológica (WALL BT et al., 2013; WALL et al., 2014). Entre pesquisadores há o consenso que as alterações mais significativas ocorrem nos primeiros 7 dias do desuso, onde o conjunto de modificações histofisiológicas decorre do desequilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas miofibrilares, redução na eficiência das vias citosólicas reguladoras do metabolismo e disfunções mitocondriais (LIMA et al., 20017; HUGHES et al., 2017; MIRZOEV TM e SHENKMAN BS, 2018).

Procedimentos fisioterapêuticos, tal como a fotobioestimulação, são utilizados no intuito de estimular o restabelecimento de funções orgânicas, neste contexto, tem sido destacado as múltiplas ações inerentes a LEDterapia quer seja estimulando o processo de cicatrização de feridas ou até minimizando a degeneração do nervo óptico lesionado (GIACCI MK, 2014). No que se refere ao mecanismo de ação da LEDterapia há descrições relatando seu potencial para estimular o citocromo C mitocondrial aumentando o consumo de oxigênio e a produção de ATP, promovendo redução na efetividade das vias deflagradas por inflamação além de promover aumento na expressão de genes que modulam a formação de citocinas anti-inflamatórias (CAMARGO et al., 2012). Além destas, tem sido observado alterações significativas na proliferação celular, diferenciação celular ou produção de colágeno (OPEL DR et al., 2015).

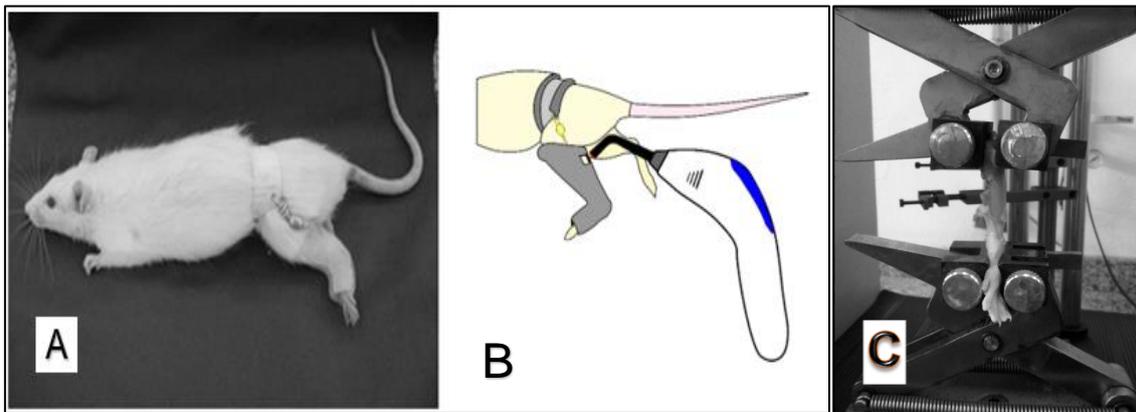
Diante disso, o objetivo foi avaliar as ações ligadas a LEDterapia na condição de imobilização tendo como eixo norteador as reservas musculares de glicogênio, a relação proteína total/DNA e o teste de tensão máxima deformação, condições ímpares para a recuperação funcional do músculo após o desuso.

MÉTODOS

Animais experimentais: Foram utilizados ratos Wistar, com 2 meses de idade (180-200g/massa) obtidos do biotério da UNIMEP/Piracicaba. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura constante de 23 ± 2 °C e ciclo claro escuro controlado de 12 h. Os animais foram distribuídos em grupos experimentais com N=6/grupo e assim denominados: Controle (C); tratado com LEDterapia (LED); Imobilizado (I); imobilizado tratado com LEDterapia (ILED). **Teste de tensão:** O teste de tensão foi realizado no dispositivo DL 2000-EMIC-Brasil da faculdade de engenharia mecânica da UNIMEP, onde o músculo gastrocnêmio foi mantido na posição longitudinal e a força de tração aplicada, garantindo com isto o máximo da aplicação da força e sequencialmente o padrão registrado. (**Figura 1C**). **Imobilização:** A imobilização foi realizada utilizando uma órtese de resina acrílica, a qual manteve a articulação do tornozelo em posição de 90°, permitindo que as articulações do joelho e quadril permanecessem livres (**Figura 1A**). No tratamento com LED, foi utilizado o aparelho BIOS THERAPY II (BIOS Indústria e Comércio de equipamentos médicos LTDA) de acordo com os parâmetros (7 dias de aplicação; 630nm; 500 mW; 8-10 J/cm² equivalente a 30-40s). A aplicação da terapia foi pontual, na qual o feixe emitido incidia no ventre do gastrocnêmio na

posição de 90° no intuito de otimizar a aplicação e acompanhando a indicação descrita no MANUAL BIOS (figura 1 B). A LED terapia foi aplicada através de uma janela de 0,9x0,9cm aberta na região que corresponde ao ventre do músculo gastrocnêmio (figura 1B). **Análise da concentração de glicogênio:** Foram coletadas amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio e encaminhados para avaliação do conteúdo de glicogênio utilizando o método do fenol em meio ácido que consiste na digestão da amostra em KOH 30%, precipitação em etanol e colorimetria na presença de ácido sulfúrico (SIU LO, 1970). **Avaliação da concentração de proteínas e DNA.** Na avaliação da concentração de proteínas foi utilizado o KIT Protal comercializado pela Labcenter enquanto na avaliação do DNA foi utilizado o Kit de extração de DNA (MINI SPIN, KASVI) seguindo o cálculo de relação proteína total/DNA conforme KUGA et al., (2018). A análise estatística dos dados foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e nas amostras que expressaram normalidade foi utilizado ANOVA two way seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal protocolo: 09/2018.

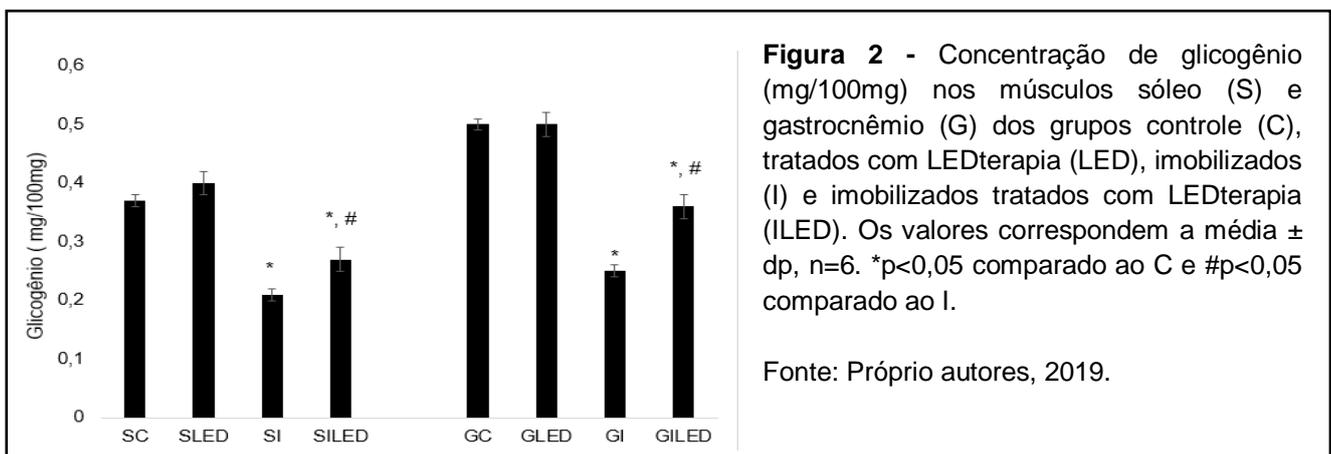
Figura 1 - Órtese de resina acrílica aplicada no membro pélvico do animal (A) e esquema representativo do procedimento de aplicação da LEDterapia (B). Em C dispositivo DL 2000-EMIC-Brasil usado no teste de tração.



Fonte: Próprio autores, 2019.

RESULTADOS

O procedimento de imobilização utilizado para induzir o desuso foi eficiente em promover redução nas reservas glicogênicas representado por valores 53% e 46%, respectivamente menores ao analisar o músculo sóleo (S) e o gastrocnêmio (G).



Dentro deste mesmo perfil de análise foi verificado que a terapia com LED não influenciou nas reservas glicogênicas tanto no músculo S quanto no G na condição de normalidade, no entanto, quando a LEDterapia foi aplicada no grupo imobilizado (I) foi observado reservas 28% e 44% maiores se comparado ao grupo I não tratado. Mesmo havendo uma ação significativa da LEDterapia nas condições metabólicas dos músculos imobilizados, as reservas ainda permaneceram 27% menores se comparados ao controle. (**Figura 2**).

A análise da concentração de proteínas (CP) nos músculos S e G tratados com LEDterapia (LED) não demonstrou diferença estatística se comparado a condição C, por outro lado, em decorrência da imobilização (I) houve redução de 34% na CP no S e 58% no G, condição que foi minimizada no grupo ILED, onde as CP do S foram 20% maiores do que o grupo I, enquanto no G foram 14% maiores, porém, ainda permaneceram 22% e 27% abaixo dos valores observados no grupo C, respectivamente aos músculos S e G. (**Figura 3 A**).

Nos mesmos grupos experimentais foram avaliadas as concentrações de DNA (cDNA) no S e G, e de forma similar ao descrito na CP, os grupos C e LED não diferiram, no entanto, condição diferenciada foi verificada no grupo I onde a cDNA foi 43% menor no S e 74% no G se comparados ao C, fato que ocorreu em menor intensidade no grupo ILED onde a cDNA apresentou valores 100% maiores no S e 33% no G, se comparado a condição I, porém, ainda 14% e 60% respectivamente menores se comparado a condição C. (**Figura 3 B**).

Após a determinação da CP muscular e a cDNA, faz-se necessário determinar a relação entre o número e o tamanho dos miócitos, para tal, foi determinado a razão proteína/DNA (PT/DNA) não sendo observado no músculo S ou G diferença entre C e LED, no entanto, no grupo I houve redução de 50% na PT/DNA do S e 42% no G, se comparado ao C. Cabe ressaltar que no grupo ILED, a PT/DNA foi 14% maior no S e 28,5% no G se comparado ao I e 36% no S e 18% menor no G, respectivamente se comparado ao C. (figura 4).

Por fim, foi aplicado o teste de tensão máxima (TM) com foco no músculo gastrocnêmio, estando os valores expressos em Kgf. Foi observado que a LEDterapia não influenciou em parâmetros que indicassem mudança na resposta a TM, uma vez que o grupo C não diferenciou de LED. Nos músculos imobilizados a resposta a TM foi 52% menor se comparado ao C e no grupo ILED, a resposta frente ao teste de TM foi 43% maior se comparado ao I e 31% menor que C. (**Figura 5**).

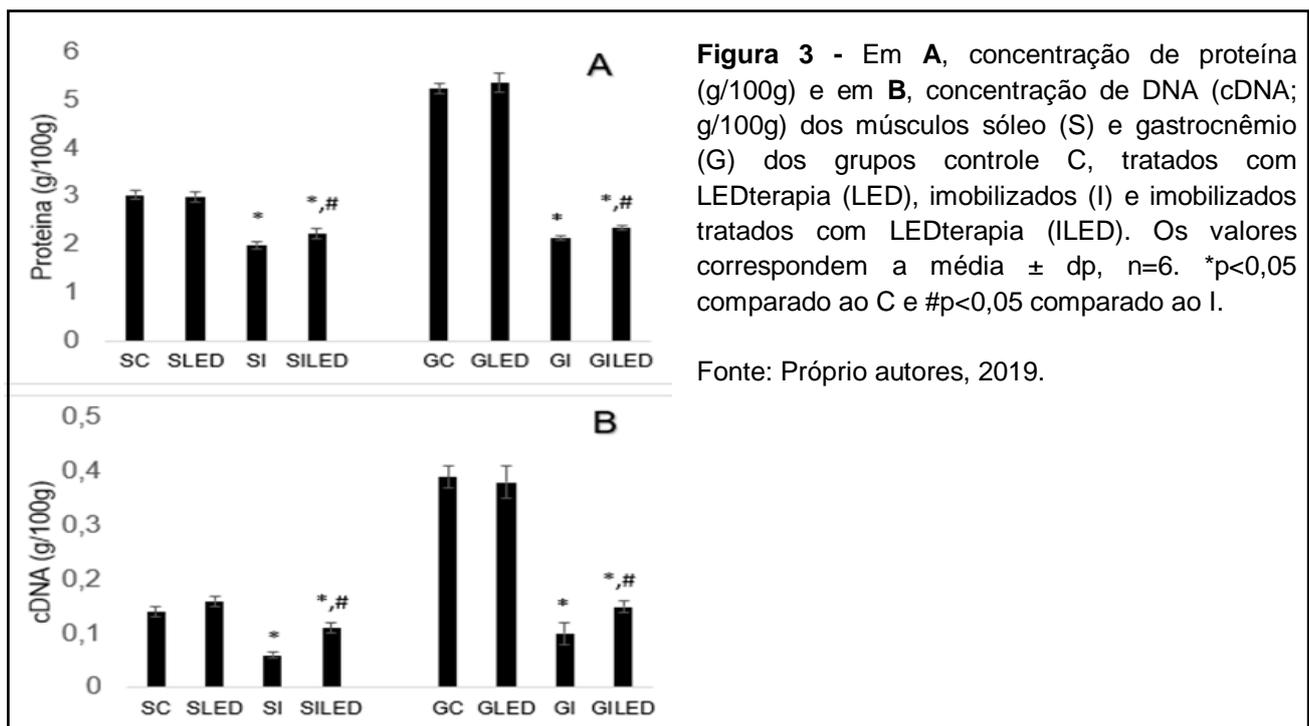
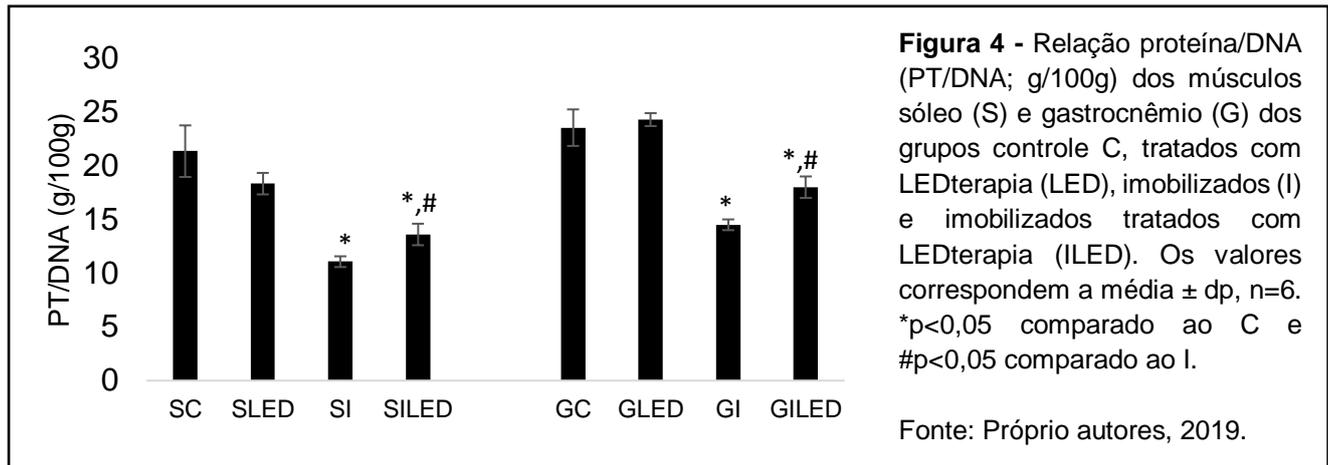


Figura 3 - Em **A**, concentração de proteína (g/100g) e em **B**, concentração de DNA (cDNA; g/100g) dos músculos sóleo (S) e gastrocnêmio (G) dos grupos controle C, tratados com LEDterapia (LED), imobilizados (I) e imobilizados tratados com LEDterapia (ILED). Os valores correspondem a média ± dp, n=6. *p<0,05 comparado ao C e #p<0,05 comparado ao I.

Fonte: Próprio autores, 2019.



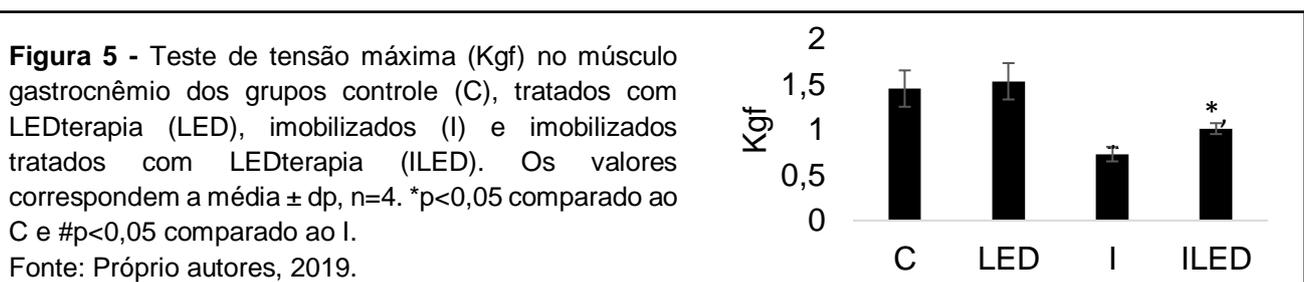
DISCUSSÃO

Avaliações ligadas ao desuso muscular crônico induzido pela imobilização e o processo de atrofia tem demonstrado que no período agudo de 7 dias, já se observa resistência à insulina comprometendo o controle da homeostasia metabólica das fibras musculares, bem como a funcionalidade do tecido muscular (SCHIAFFINO S et al., 2013). Os dados aqui apresentados indicam que devido ao desuso houve redução expressiva nas reservas glicogênicas tanto nas fibras tipo I quanto nas fibras tipo II, com maior intensidade nas fibras tipo I (KASPER CE et al., 2002).

Tem sido consenso em diversos estudos que na fase aguda da imobilização muscular (7 dias) há redução nas reservas energéticas e na expressão das proteínas AKT e IRS-1, evidenciando comprometimento na eficiência da sinalização insulínica (KOIKE TE et al., 2018). Os dados aqui apresentados ao demonstrar redução nas reservas glicogênicas e na relação proteína/DNA, reforçam a amplitude dos processos desencadeados que culminam com a atrofia.

Cientistas tem utilizado fototerapia com LED em diferentes protocolos de tratamento, fundamentado no fato da capacidade da luz em ativar processos fisiológicos celulares (PAOLILLO FR et al., 2011; HYATT H et al., 2018). Uma hipótese aceita indica que as células apresentam sistemas receptores sensíveis aos fótons, e estes, uma vez estimulados pela luz, promovem modificações na permeabilidade da membrana celular, nos sistemas transportadores transmembrânicos além de estimular enzimas mitocondriais, tais como a citocromo oxidase, promovendo aumento da produção de ATP (BORSA PA et al., 2013; DE FREITAS LF e HAMBLIN MR, 2016).

Os dados aqui apresentados demonstram que na condição de normalidade a LEDterapia não promoveu modificação nos parâmetros reservas glicogênicas, proteínas teciduais, quantidade de DNA, nem na relação proteína/DNA, possivelmente na condição de normalidade, onde os sistemas fisiológicos estão íntegros, a maior sensibilidade os sistemas reguladores neurais ou endócrinos, podem ser primários no controle da homeostasia. Ao analisarmos o mesmo perfil em músculos imobilizados foi verificado que a LEDterapia minimizou as alterações geradas pela imobilização, uma vez que, os grupos tratados apresentaram significativamente melhores no aspecto metabólico e estrutural se comparado ao grupo imobilizado não tratado.



Estudos demonstraram que a LEDterapia ao exercer potente ação vasodilatadora arteriolar eleva o fluxo sanguíneo no local da aplicação, condição que contrapõe a redução na capilarização já descrita no desuso, permitindo com isso o maior oferecimento de substratos metabolizáveis as fibras musculares em desuso (KARU T, 2010). Importante estudo com atletas submetidos a LEDterapia demonstrou aumento na performance ao realizar um protocolo de fadiga do quadríceps, tal fato, pode ter relação com o melhor suprimento sanguíneo para o músculo e estímulo da cadeia respiratória mitocondrial, assim, estes fatores associados podem ter contribuído para as melhores condições observadas nos músculos imobilizados tratados e apresentados neste estudo (KARU T, 2010).

Estudos experimentais têm descrito que músculos submetidos a imobilização apresentam redução na síntese do colágeno, quantidade de água e glicosaminoglicano, o que torna a fibra muscular menos elástica (TIMMER LT, 2018). Estes estudos justificam nossos resultados que demonstram menor resposta ao teste de tensão apresentado no músculo submetido a imobilização.

Análises histológicas e histomorfométrica demonstraram que o tratamento com LED durante 7 dias, promove aumento qualitativo e quantitativo no número de fibroblastos já aos sete dias de tratamento, propiciando com isso aumento no conteúdo de colágeno tecidual (JAGDEO J et al., 2018). Cabe destacar que, esta ação pode ter permitido a maior resistência a tração no músculo imobilizado sendo o tratamento significativo para minimizar as alterações morfofuncionais geradas pelo desuso.

CONCLUSÃO

O tratamento de músculos imobilizados com LED foi efetivo em minimizar a redução nas reservas glicogênicas, bem como propiciou a manutenção da relação proteína/DNA, fatores primordiais para a melhora na resposta frente as exigências oferecidas quando submetido a tensão, estes dados demonstram a importância e a versatilidade da aplicação do LED.

REFERÊNCIAS

1. CAMARGO MZ, SIQUEIRA CPCM, PRETI MCP, et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscle damage in rats. *Lasers in Medical Science*. v.27, n.5, p.1051–1058, 2012.
2. DE FREITAS LF, HAMBLIN MR. Proposed mechanisms of photo biomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.*, v.22, n.3, p.17-20, 2016.
3. GIACCI MK, et al. Differential effects of 670 and 830 nm red near infrared irradiation therapy: a comparative study of optic nerve injury, retinal degeneration, traumatic brain and spinal cord injury. *PLoS One.*, v.8, e104565, 2014.
4. HYATT H, et al. Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: A review of the causes and effects. *Arch Biochem Biophys.*, v.662: p.49-60, 2018.
5. HUGHES DC, MARCOTTE GR, MARSHALL AG, et al. Age-related differences in dystrophin: impact on force transfer proteins, membrane integrity, and neuromuscular junction stability. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, v. 72, p.640–648, 2017.
6. JAGDEO J, et al. Light-Emitting Diodes in Dermatology: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Lasers in Surgery and Medicine.*, v.12, p. 1–16, 2018.
7. KASPER CE, et al. Skeletal muscle damage and recovery. *AACN Clin Issues*. v.13, n.2, p.237-47, 2002.
8. KOIKE TE, et al. Exercício físico após imobilização de músculo esquelético de ratos adultos e idosos. *Rev Bras Med Esporte [online]*. v. 24, n.1, p. 60-63, 2018.
9. KARU T. Mitochondrial mechanisms of photo biomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg*. v.28,n.2, p.159-60, 2010.
10. KUGA GK, GASPARGO RC, MUÑOZ VR, et al. Physical training reverses changes in hepatic mitochondrial diameter of Alloxan-induced diabetic rats. *Einstein (São Paulo)*. v.16, n.3: p.1-8, 2018.
11. LIMA SC, et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfoométricas e mecânicas no músculo de rato. *Rev. Bras. Fisioter.*, v.11, n.4, p.297-302, 2007.
12. MIRZOEV TM, SHENKMAN BS. Regulation of Protein Synthesis in Inactivated Skeletal Muscle: Signal Inputs, Protein Kinase Cascades, and Ribosome Biogenesis. *Biochemistry (Mosc.)*, v.83, n.11, 1299-1317, 2018.
13. OPEL DR, et al. Light-emitting diodes: A brief review and clinical experience. *J Clin aesthetic Dermatol*. v.8, n.6, p.32-36, 2015.
14. SCHIAFFINO S, et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*. v.280, n.17, p.4294-314, 2013.
15. TIMMER LT, et al. The Role of IGF-1 Signaling in Skeletal Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol.*, v. 1088, p.109-137, 2018.
16. WALL BT, et al. Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia. v.12, n.4, p.98-906, 2013.
17. WALL BT, DIRKS ML, SNIJDERS T, SENDEN JM, DOLMANS J, VAN LOON LJ. Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta physiologica.*, v.210, n.3, p.600–11, 2014.