

Artigo original

Imobilização em flexão plantar do tornozelo induz alteração metabólica em músculo esquelético de ratos

Ankle plantar flexion immobilization infers metabolic alteration in rats skeletal muscle

Carolina Náglio Kalil Dias*, Carlos Alberto da Silva, D.Sc.** , Rinaldo Guirro, D.Sc.*** ,
Karina Maria Cancelliero, M.Sc.**** , Luciano Júlio Chingui*****

.....
*Acadêmica do Curso de Fisioterapia – UNIMEP, **Professor da Faculdade de Ciências da Saúde – UNIMEP,

Professor da Faculdade de Ciências da Saúde – UNIMEP, *Mestre em Fisioterapia – UNIMEP e Doutoranda em Fisioterapia – UFSCar, *****Acadêmico do curso de Fisioterapia – UNIMEP

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações metabólicas no músculo esquelético após imobilização de membro posterior de ratos em flexão-plantar de tornozelo. Ratos machos Wistar foram divididos em 2 grupos (n = 6), controle e imobilizado 7 dias. Após o período experimental, os animais foram sacrificados e os músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e vermelho (GV), tibial anterior (TA) e extensor longo dos dedos (ELD), coletados para análise do glicogênio (GLI) e o S e ELD, para avaliação do peso. A análise estatística foi feita pela ANOVA e teste t (p < 0,05). A imobilização promoveu redução no GLI em 63% no S, 50% no GB, 50% no GV, 61,9% no TA e 56,2% no ELD. O peso muscular foi reduzido em 39,3% no S e 7% no ELD. A órtese mostrou-se efetiva em promover alterações anátomo-fisiológicas, sugerindo sua aplicação em outros estudos.

Palavras-chave: imobilização, músculo esquelético, atrofia muscular, glicogênio.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the metabolic alteration in skeletal muscle after immobilization in ankle plantar flexion. Male rats Wistar were divided in 2 groups (n = 6): control and immobilized 7 days. After the experimental period the animals were sacrificed and soleus (S), white gastrocnemius (WG) and red (RG), anterior tibial (AT) and extensor digitorum longus (EDL) muscles collected for glycogen analysis (GLY) and S and EDL for weight evaluation. The statistic analysis was performed by ANOVA and t test (p < 0.05). The immobilization promoted GLY reduction of 63% in S, 50% in WG, 50% in RG, 61,9% in AT and 56,2% in EDL. The muscular weight was reduced in 39,3% in S and 7% in EDL. The orthosis was effective to promote anatomic and physiologic alterations, suggesting its utilization in other studies.

Key-words: immobilization, skeletal muscle, muscular atrophy, glycogen.

Introdução

Lesões nos desportos, doenças degenerativas articulares, fraturas ósseas, rupturas ligamentares ou desnervação são situações clínicas que podem levar à imobilização do membro, acarretando, inevitavelmente, atrofia e alterações no metabolismo muscular.

Segundo Garret e Best [1], para haver uma homeostasia energética das fibras musculares, deve-se ter uma integridade entre as estruturas musculares e a placa motora, além de uma constância do suprimento de substratos metabólicos.

O principal substrato energético utilizado pelas fibras musculares é a glicose, cuja absorção é de caráter multifatorial, dependente da insulina, do metabolismo dos tecidos ou da elevação da atividade contrátil das fibras [2].

Há tempos vem se observando que a imobilização promove fraqueza e atrofia muscular, e só nos anos 90 foi verificado o comprometimento nas vias sinalizadoras de insulina e no transporte de glicose. Estudos mostram que, de forma concomitante com a imobilização, existe modificação na homeostasia do músculo esquelético, comprome-

Artigo recebido em 15 de dezembro de 2004; aceito em 15 de junho de 2005.

Endereço para correspondência: Karina Maria Cancelliero, Rua Gomes Carneiro, 875 Centro 13400-530 Piracicaba SP, Tel: (19) 3434-0322, E-mail: karca@terra.com.br

tendo ou não a síntese de proteínas miofibrilares, afetando a dinâmica contrátil e integridade das vias metabólicas, que juntas precedem o processo de atrofia.

Antigos estudos se contradiziam com relação ao tipo de fibra mais susceptível à atrofia decorrente de imobilização. Segundo McDougall *et al.* [3], as fibras brancas (tipo II) são as que mais sofrem atrofia por desuso muscular. Porém, Booth e Kelso [4] se referiram às fibras vermelhas (tipo I) como as que apresentam atrofia mais evidente. Entretanto, investigadores como Williams e Goldspink [5] apresentaram trabalhos que não evidenciam qualquer diferença no comportamento dos diferentes tipos de fibras à atrofia. Porém, os estudos mais atuais mostram que a fibra tipo I é a mais susceptível à atrofia gerada pelo desuso muscular [6].

A imobilização em diferentes períodos gera uma atrofia muscular de 15% a 70%, dependendo do animal e do tipo de fibra, mas a maior perda ocorre nos primeiros 7 dias [7].

A posição de imobilização também é fator determinante para a quantificação do processo de atrofia muscular. O número de sarcômeros é ajustado de forma que seja permitido um comprimento ótimo destas estruturas, ocorrendo assim, um “overlap” ideal dos filamentos para desenvolver tensão durante as contrações [8]. Segundo Apell [9], se o músculo for imobilizado em posição de encurtamento, ocorre uma diminuição significativa do comprimento muscular por diminuição do número de sarcômeros. Williams e Goldspink [5] afirmaram que, se o músculo for imobilizado em posição de alongamento, ocorre aumento de tamanho através da elevação do número de unidades sarcoméricas.

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi confeccionar uma órtese de metacrilato de etila, obedecendo aos parâmetros de adaptação e funcionalidade, e verificar as alterações metabólicas e funcionais, induzidas por imobilização de membro posterior de ratos em flexão plantar do tornozelo, durante 7 dias.

Material e métodos

Ratos albinos *Wistar*, com idade de 3 a 4 meses foram alimentados com ração e água *ad libitum* e submetidos a ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro, sob temperatura controlada. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais (n = 6): controle (C) e imobilizado (I).

A imobilização foi aplicada no membro posterior esquerdo com órtese de resina acrílica em flexão plantar do tornozelo durante 7 dias, sendo que o sóleo foi mantido em posição de encurtamento e o extensor digital longo em alongamento.

A confecção da órtese de metacrilato de etila (figura 1) obedeceu ao padrão utilizado na odontologia, passando pelas seguintes fases: moldagem; modelagem; desgaste do modelo; expulsividade; aplicação da resina acrílica; acrilização; expulsão.

Para a órtese ser acoplada no membro posterior do animal, foram utilizados canos de PVC cortados com aproximadamente 2cm de largura, para envolver o abdome como uma cinta, e também rotadores de pesca para unir a órtese com a cinta e possibilitar a movimentação normal do animal (figura 2). Esta movimentação foi realizada através do arrastamento do membro imobilizado, sem haver descarga de peso. Este modelo de imobilização foi de baixo custo, baixo peso (aproximadamente 22 gramas) e permitiu a mobilidade do rato.

Após o período experimental, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os músculos sóleo, gastrocnêmio branco, gastrocnêmio vermelho, tibial anterior e extensor longo dos dedos foram coletados para análise do glicogênio, através do método fenol sulfúrico, segundo SIU *et al.* [10], no qual as amostras foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio, precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 15 minutos. Após a precipitação, o glicogênio foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol. Os valores foram expressos em mg/100mg de peso úmido.

A avaliação do peso foi realizada nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos. A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância seguida do teste de Tukey. Em todos os cálculos, foi fixado o nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

Figura 1 - Modelo da órtese de metacrilato de etila com o molde de gesso inserido, mostrando a manutenção da articulação do tornozelo em flexão plantar. A cinta abdominal é acoplada à órtese com rotadores laterais, permitindo a mobilidade e a funcionalidade do animal.

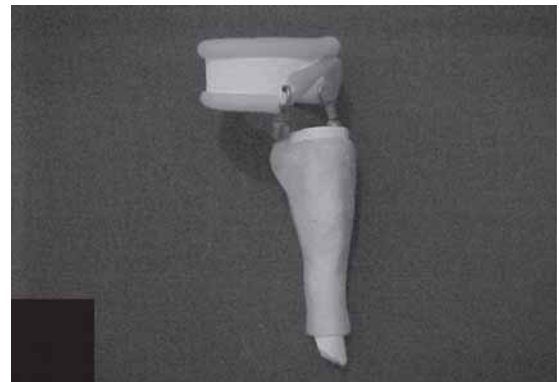


Figura 2 - Órtese adaptada ao membro posterior esquerdo do animal.

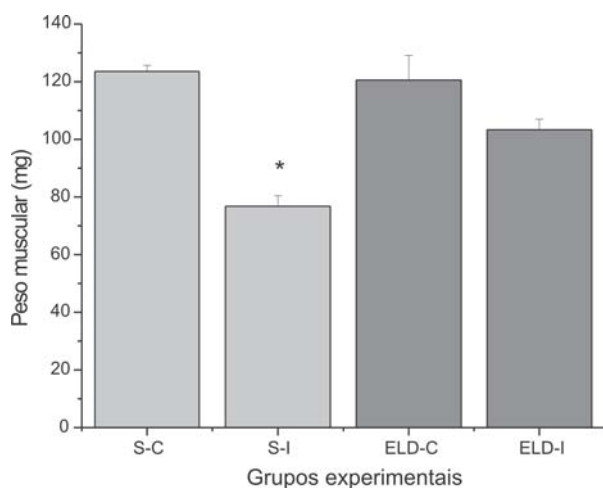


Resultados

O desuso muscular, decorrente da imobilização durante 7 dias, promoveu alterações na dinâmica metabólica muscular concomitantemente às alterações na dinâmica da placa motora. As reservas de glicogênio foram comprometidas em todos os músculos analisados, havendo redução significativa de 63,2% no sóleo (C: $0,38 \pm 0,03$ (média \pm epm) e I: $0,13 \pm 0,009$ mg/100mg), de 30,5% no gastrocnêmio branco (C: $0,46 \pm 0,02$ e I: $0,31 \pm 0,02$), de 41,5% no gastrocnêmio vermelho (C: $0,41 \pm 0,01$ e I: $0,24 \pm 0,02$), de 48,4% no tibial anterior (C: $0,31 \pm 0,03$ e I: $0,15 \pm 0,01$) e de 41,7% no extensor digital longo (C: $0,36 \pm 0,03$ e I: $0,21 \pm 0,02$), como pode ser observado na Tabela I.

Com relação ao peso muscular, foi observada uma redução de 38% no sóleo, que permaneceu na posição de encurtamento, porém não houve diferença estatística no extensor longo dos dedos, o qual permaneceu em posição de alongamento, como pode ser observado na figura 3.

Figura 3 - Valor da média \pm epm do peso muscular (mg) do sóleo (S) e extensor longo dos dedos (ELD) dos grupos controle (C) e imobilizado 7 dias (I). $n = 6$, $p < 0,05$ * comparado ao grupo controle.



Discussão

Situações clínicas encontradas na prática fisioterapêutica como fraturas ósseas, doenças degenerativas articulares, lesões miotendinosas, permanência no leito por longo tempo, lesão medular ou rupturas ligamentares, acarretam, inevitavelmente, imobilização do membro, gerando alterações

no processo contrátil e no metabolismo muscular de glicose, que leva à atrofia muscular. Segundo Qin *et al.* [7], a imobilização tem a função de tratar lesões teciduais e ósseas, levando à atrofia muscular e à redução da performance muscular.

O desuso muscular crônico, produzido por condições de longo período na cama, gesso ou osteossíntese em membros e microgravidade leva à resistência à insulina e a um estado catabólico no músculo esquelético afetado, em humanos [11,12].

Em estudos animais, incluindo aqueles com ratos, confirmou-se que a imobilização é associada à resistência à captação de glicose induzida pela insulina [13]. Segundo Thompson *et al.* [14], o desuso muscular causa progressivo decréscimo na força, associado ao decréscimo na área de secção transversa das fibras musculares. A atrofia muscular é o resultado do decréscimo da síntese de proteínas musculares, seguido da quebra de proteínas e, segundo Wineski [15], essa atrofia resulta em diminuição do conteúdo de proteínas musculares. A resistência à insulina é também o maior problema em pacientes doentes criticamente, os quais são inativos fisicamente e/ou imobilizados [16].

Porém, ainda não está claro se, ou como, o desuso muscular crônico ou a imobilização alteram a sinalização de insulina, embora sejam situações conhecidas por diminuir a captação de glicose estimulada pela insulina.

A manutenção das reservas de glicogênio muscular faz parte de um dos mecanismos ativados pela insulina. A condição de desuso muscular pode promover a diminuição dos transportadores GLUT-4 pelo desenvolvimento da resistência ao transporte de glicose, estimulado pela insulina [17,18]. Esta alteração na dinâmica de sinalização da insulina pode explicar a redução nas reservas de glicogênio em todos os músculos analisados sob a condição aguda de imobilização.

A posição articular interfere no grau da atrofia, havendo maior déficit quando o músculo se encontra encurtado. Os resultados mostraram que a atrofia significativa ocorreu no músculo sóleo, que se manteve na posição de encurtamento, além de sofrer maior redução nas reservas de glicogênio. Picquet *et al.* [19] mostraram que a posição de encurtamento pode gerar atrofia muscular pela não ativação de sensores de estiramento no músculo nesta posição.

Outros autores associam o tipo de fibras ao grau de atrofia muscular, sendo que como o sóleo possui um maior número de fibras tipo I e o extensor digital longo mais fibras do tipo II, o primeiro músculo sofre mais pela diminuição

Tabela I - Valor da média \pm epm da concentração de glicogênio dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), tibial anterior (TA) e extensor digital longo (EDL) dos grupos controle e imobilizado 7 dias. $N = 6$, $p < 0,05$ * comparado ao grupo controle.

	S	GB	GV	TA	EDL
Controle	$0,38 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,03$
Imobilizado	$0,13 \pm 0,009^*$	$0,31 \pm 0,02^*$	$0,24 \pm 0,02^*$	$0,15 \pm 0,01^*$	$0,21 \pm 0,02^*$

de estímulo durante a imobilização, na qual não há descarga de peso, diminuindo a solitação das fibras posturais [6,20]. Ploug *et al.* [13] observou, ainda, que o músculo sóleo, que é um músculo postural, normalmente tem uma atividade basal maior do que os não posturais, o que explica sua susceptibilidade à inatividade.

Tanaka *et al.* [6] ainda afirmam que as fibras musculares rápidas atrofiam mais na desnervação e na tenotomia, porém atrofiam menos na imobilização, e que, nos músculos lentos, há uma redução de peso, atrofia de fibras e uma transformação de tipos de fibras lentas em fibras do tipo rápidas, conseqüente à imobilização.

Os resultados deste trabalho corroboram com os estudos acima citados, pois o sóleo foi o músculo que mais sofreu pela diminuição do estímulo, mesmo sendo um modelo de imobilização diferente dos outros, como por exemplo, a suspensão do membro, uso de gesso, tecidos de contenção [20,21].

Conclusão

Este novo modelo de imobilização foi eficaz na indução de atrofia muscular e do comprometimento metabólico. Como esta situação é muito freqüente na prática clínica fisioterapêutica, este modelo pode ser utilizado em estudos futuros para a aplicação de recursos fisioterapêuticos, como por exemplo a eletroestimulação, a fim de retardar a atrofia muscular e minimizar as alterações metabólicas induzidas por desuso muscular.

Referências

1. Garret Jr WE, Best TM. Anatomy, physiology and mechanics of skeletal muscle. In: Simon SR (ed). Orthopaedic basic science. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994. p. 89-126.
2. Andersen PH, Lund S, Schmitz O, Junker S, Kahn BB, Petersen O. Increased insulin-stimulated glucose uptake in athletes: the importance of GLUT4 mRNA, GLUT4 protein and fibre type composition of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1993;149:393-404.
3. McDougall JD, Elder GCB, Sale DC, Moroz JR, Sutton JR. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. *Eur J Appl Physiol* 1980;43:25-34.
4. Booth FW, Kelso JR. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Pflugers Arch* 1973;342:231-338.
5. Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties of immobilized muscle. *J Anat* 1978;127(3):459-68.
6. Tanaka T, Kariya Y, Hoshino Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. *J Orthop Sci* 2004;9:76-85.
7. Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78:512-7.
8. Herring SW, Grimm AF, Grimm BR. Regulation of sarcomere number in skeletal muscle: a comparison of hypotheses. *Muscle Nerve* 1984;7:161-73.
9. Appell HJ. Morphology of immobilized skeletal muscle and the effects of a pre- and postimmobilization training program. *Int J Sport Med* 1986;7(1):6-12.
10. Siu, LO, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 1970;28(2):234-6.
11. Ferrando AA, Lane HW, Stuart CA, Davis-Street J, Wolfe RR. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am J Physiol* 1996;270:E627-33.
12. Stein TP, Schuller MD, Boden G. Development of insulin resistance by astronauts during spaceflight. *Aviat Space Environ Med* 1994;65:1091-6.
13. Ploug T, Ohkuwa T, Handberg A, Vissing J, Galbo H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995;268:E980-6.
14. Thompson C. Experimental muscular atrophy. *J Bone Joint Surg Am* 1994;564-71.
15. Wineski LE, von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Pitts AS, Potter DE, Paulsen DF. Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature, male rats. *Cells Tissues Organs* 2002;171:188-98.
16. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JAJ. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E1235-41.
17. Henriksen EJ, Rodnick KJ, Mondon CE, James DE, Holloszy JO. Effects of denervation or unweighting on GLUT-4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 1991;70:2322-7.
18. Block NE, Menick DR, Robinson KA, Buse MG. Effects of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J Clin Invest* 1991;88:1546-52.
19. Picquet F, Falempin M. Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. *Exp Neurol* 2003;182:186-94.
20. Herrera NM Jr, Zimmerman AN, Dykstra DD, Thompson LV. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2001;82:930-4.
21. Salvini TF, Coutinho EL, Gomes ARS, França CN. A new model for immobilization on the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1329-32. ■