

Artigo original

Reabilitação diafragmática de ratos pós-imobilização com terapia aquática

Diaphragmatic rehabilitation post-immobilization with aquatic therapy in rats

Francisco Fleury Uchôa Santos-Júnior*, André Luiz de Oliveira Souza**, Francisca Glêrrethe Sales Franco***, Nívea Maria André***, Vânia Marilande Ceccatto****

.....
Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO/UECE, Faculdade de Tecnologia Intensiva, Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica da Universidade Estadual do Ceará-UECE, **Faculdade de Tecnologia Intensiva, Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica da Universidade Estadual do Ceará-UECE, *Faculdade de Tecnologia Intensiva, ****Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica da Universidade Estadual do Ceará-UECE*

Resumo

A imobilização é um processo que acomete diversos elementos corporais, incluindo o balanço proteico entre síntese e degradação, decorrentes da atrofia. A terapia aquática é uma atividade que favorece o desenvolvimento muscular e pode ser utilizada como mecanismo de recuperação funcional. O objetivo foi verificar se existe alteração na quantidade de proteínas no músculo respiratório de ratos após imobilização de pata, recuperados por terapia aquática. Foram utilizadas 20 ratas Wistar fêmeas com ± 8 semanas divididas em: Controle (C), Imobilizado (I), Terapia aquática (TA) e Terapia Aquática pós Imobilização (TAI). A imobilização ocorreu por duas semanas, envolvendo o tronco e o membro inferior direito. Os animais foram anestesiados (ketamina/xilazina) e sacrificados para a retirada do diafragma. A terapia aquática ocorreu por três semanas, seis dias por semana iniciando com 2 minutos com acréscimo de dois minutos por dia chegando à duração de 36 minutos no último dia. Para a avaliação muscular foi realizada a dosagem de proteínas musculares, pelo método de Bradford (1976), e de nitrito muscular, relacionado ao ciclo de degradação proteica, por meio do Reagente de Griess. Para a análise estatística utilizou-se Anova One-Way, com post hoc de Tukey e teste de correlação de Pearson, com significância de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média (\pm) erro padrão. Na dosagem de proteínas obtiveram-se os seguintes valores: de $47,63 \pm 7,016$ para o C, $29,80 \pm 3,326$ para o I, $68,69 \pm 1,661$ para o TA e $39,53 \pm 4,004$ para o TAI, de modo que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos C x I, C x TA, I x TA e TA x TAI. No que diz respeito à dosagem de nitrito, os achados foram de $0,5004 \pm 0,09548$ para o C, $1,210 \pm 0,1503$ para o I, $0,4371 \pm 0,07535$ para o TA e $0,7288 \pm 0,1153$ para o TAI, de forma que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos C x I, I x TA e I x TAI. Houve correlação entre proteína e nitrito ($p < 0,0001$) e esta é negativa ($-0,852$). Os animais do grupo TAI apresentaram normalização no conteúdo e degradação de proteínas em relação ao C. Fato evidenciado pela igualdade do quantitativo das proteínas e de seu produto de degradação (nitrito).

Palavras-chave: músculo, ratos, imobilização.

Abstract

Immobilization is a process that affects many body elements, including balance between protein synthesis and degradation, resulting from atrophy. The aquatic therapy promotes muscle strength and can be used as a mechanism for functional recovery. This study aimed at establishing changes in protein content in respiratory muscles of rats after paw immobilization, recovered by aquatic therapy. We used 20 female Wistar rats with ± 8 weeks divided into: control (C), Immobilization (I), Aquatic Therapy (AT) and Aquatic Therapy after Immobilization (IAT). The period of immobilization was two weeks, involving the trunk and lower limb. The animals were anesthetized (ketamine/xylazine) and sacrificed for removal of the diaphragm. The water therapy was performed for three weeks, six days a week, beginning with 2 minutes-session and increase by two minutes until 36 minutes on the last day. Measurement of muscle protein was used to assess muscle strength, according to Bradford method, and nitrite, related to protein degradation cycle, was assessed using Griess Reagent System. For statistical analysis we used One-Way Anova with post hoc Tukey test and Pearson correlation, with significance of $p < 0.05$. The results were expressed as mean (\pm) SEM. The protein measurement values were as following: 47.63 ± 7.016 for C, 29.80 ± 3.326 for the I, 68.69 ± 1.661 to ± 4.004 RT and 39.53 to TAI, so there was no statistical difference ($p < 0.05$) between groups C x I x C x TA I and TA x TA x TAI. As regards to nitrite, the findings were 0.5004 ± 0.09548 to C, 1.1503 ± 1.210 for the I, 0.4371 ± 0.07535 to RT and 0.7288 ± 0.1153 for the IAT, so there was no statistical difference ($p < 0.05$) between groups C x I, I x I x TA and TAI. There was correlation between protein and nitrite ($p < 0.0001$) and this is negative (-0.852). The animals of TAI group showed normalized content and protein degradation in relation to C. This is evidenced by the equal quantity of protein and its degradation product (nitrite).

Key-words: muscle, rats, immobilization.

Recebido em 12 de fevereiro de 2012; aceito em 22 de novembro de 2012.

Endereço para correspondência: Vânia Marilande Ceccatto, Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica da Universidade Estadual do Ceará-UECE, Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60740-903 Fortaleza CE, E-mail: vania.ceccatto@uece.br

Introdução

Dentre os recursos mais aplicados na prática clínica do consultório ortopédico, a imobilização é um recurso comum em patologias álgicas e nas fraturas, porém, seu entendimento fisiológico ainda necessita ser ampliado. Pequenos períodos podem acarretar diversos prejuízos à região imobilizada, especialmente a condição de hipotrofia/atrofia muscular [1]. Além dessa questão, a imobilização causa influência em outras partes do organismo, incluindo e, especialmente, o metabolismo [2-4].

De um modo geral, o processo de atrofia muscular está diretamente ligado a alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que afetam a funcionalidade dos músculos envolvidos [5]. O tecido muscular se caracteriza por realizar contrações (ciclos de estiramento/encurtamento) e essa contratilidade parece ser determinante na massa muscular e pode anteceder sinais endócrinos para a depleção proteica no músculo. Além disso, os músculos mantidos inativos são mais sensíveis aos sinais catabólicos dos hormônios contrarregulatórios [6,7], favorecendo a perda em relação ao ganho proteico e de massa muscular, conseqüentemente. Pesquisas com músculos isolados mostraram que a taxa de transporte de aminoácidos está diretamente ligada à atividade contrátil [6,8], portanto, quando esta se torna inativa, como acontece durante um processo de imobilização, estará relacionada a um menor transporte de aminoácidos e degradação proteica.

A hipotrofia muscular e a perda de força é uma das primeiras e mais óbvias modificações que ocorrem como resultado da imobilização. Essa perda de massa muscular é mais acentuada nas primeiras 72 horas, com índices de 14 a 17%, reduzindo sua velocidade após uma semana de imobilização [9-11]. Além de ocorrer uma perda sensível de força muscular, outro fator relevante no processo é a velocidade de síntese proteica, que começa a declinar seis horas após o início da imobilização [10], comprometendo ainda mais o organismo. Observa-se ainda que o acúmulo do tempo de imobilização gera ainda mais prejuízos a saúde do paciente, de modo que três semanas de imobilização resultam em uma perda de 47% da força muscular [12].

O processo de hipotrofia/atrofia da musculatura esquelética resultante da ausência de cargas é uma das maiores mudanças associadas com o descondicionamento físico, interferindo inclusive em atividades de rotina do paciente [13]. Atualmente, ao induzir atrofia muscular experimental, que se aproxime das condições de restrição ao leito e hipoatividade, dois modelos são considerados os mais apropriados: a suspensão e a imobilização [14]. As técnicas de inervação, transecção de raiz neural ou medular, tenotomia, fixação das articulações com pinos e castração, utilizadas para mimetizar a hipoatividade, apresentam particularidades que podem alterar os índices de atrofia, quando comparados aos dois previamente citados [15,16].

A imobilização gessada permite a integridade dos nervos, músculos e tendões. Não é invasiva e evita a descarga sobre os

membros imobilizados, facilitando o estudo dos efeitos da diminuição do trabalho muscular, além de ser um procedimento próximo às condições que vivenciamos na prática clínica e permitindo mais facilmente o estudo dos acontecimentos decorrentes deste processo [15,16]. No protocolo de imobilização experimental apresentado neste trabalho, com o uso de esparadrapo, foi possível maior facilidade na condução dos experimentos [17].

Diversos estudos abordam a questão do músculo esquelético no processo de imobilização, entretanto poucos trabalhos estão diretamente ligados aos efeitos desta no músculo respiratório. Este estudo surge na tentativa de preencher essa lacuna, com o objetivo de verificar se existe alteração na quantidade de proteínas no músculo respiratório de ratos após imobilização de pata, recuperados por terapia aquática.

Material e métodos

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA da Universidade Estadual do Ceará, sob o prot. nº 10725887-0. Foram utilizadas 20 ratas Wistar fêmeas com \pm 8 semanas divididas igualmente em: Controle (C), Imobilizado (I), Terapia aquática (TA) e Terapia Aquática pós Imobilização (TAI), com peso corporal médio de $200\text{g} \pm 15$ provenientes da UECE. Sob temperatura de 22°C a 25°C com ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro, recebendo ração e água *ad libitum*.

Para a imobilização, os animais foram anestesiados com Cetamina 60mg/kg e Xiliasina $8(\text{oito})\text{mg/kg}$ de peso do animal. A imobilização do membro posterior direito foi efetuada de acordo com o modelo proposto por Santos-Júnior *et al.* [17], que envolve o tronco, o quadril e o joelho em extensão e o tornozelo em flexão plantar.

A terapia aquática foi realizada em um reservatório de 20 litros, fabricado em plástico, com 60 cm de profundidade e com registro para esvaziamento, foi colocado em uma sala, de modo a manter as condições de higiene, temperatura e luz adequada.

O tanque foi enchido com água fornecida pelo sistema de saneamento de Fortaleza captado na UECE. A temperatura da água mantida em torno de 32°C , por meio de um termostato.

Os animais dos grupos TA e TAI foram submetidos a um programa de atividade aquática em um período de três semanas iniciando com 2 minutos, com acréscimo de dois minutos por dia chegando à duração de 36 minutos no último dia. Os animais foram colocados no reservatório de água e, durante o treinamento, foram utilizadas cargas equivalentes a 5,0 % do peso corporal, atadas ao dorso da cauda. Cada animal, durante a terapia aquática, ficou sob observação para não apoiar na borda do tanque ou flutuar, deixando de se movimentar.

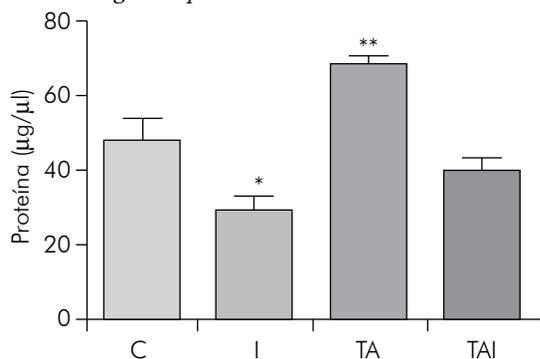
Os exercícios foram realizados no período da manhã, seis dias por semana com descanso aos domingos. Após a natação as ratas foram secas por meio de um equipamento de fluxo de ar quente [18]. Após o período de três semanas em que foram submetidas aos exercícios, as ratas foram sacrificadas.

Ao fim do tratamento os animais foram novamente anestesiados, da forma citada acima. Em seguida, sacrificados para posterior dissecação do diafragma. Para a avaliação muscular foi realizada a dosagem de proteínas musculares, pelo método de Bradford [19], e de nitrito muscular, relacionado ao ciclo de degradação proteica, por meio do Reagente de Griess. Para a análise estatística utilizou-se Anova One-Way, com post hoc de Tukey e teste de correlação de Pearson, com significância de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média (\pm) erro padrão.

Resultados

Como resultado da dosagem de proteínas obtiveram-se os seguintes valores: de $47,63 \pm 7,016$ para o C, $29,80 \pm 3,326$ para o I, $68,69 \pm 1,661$ para o TA e $39,53 \pm 4,004$ para o TAI, de modo que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos C x I, C x TA, I x TA e TA x TAI (Figura 1).

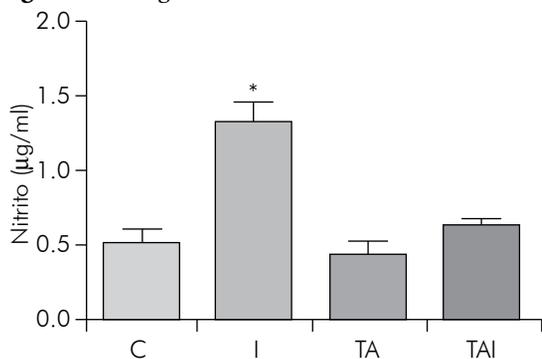
Figura 1 - Dosagem de proteínas.



C = Controle; I = Imobilizado; TA = Terapia Aquática; TAI = Terapia Aquática pós Imobilização; $p < 0,05$. * - diferente do C, TA; ** - diferente do C, TAI.

Já na avaliação da dosagem de nitrito muscular do diafragma, os achados foram de $0,500 \pm 0,09$ para o C, $1,210 \pm 0,15$ para o I, $0,437 \pm 0,07$ para o TA e $0,728 \pm 0,11$ para o TAI, de forma que foi identificada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos C x I, I x TA e I x TAI (Figura 2).

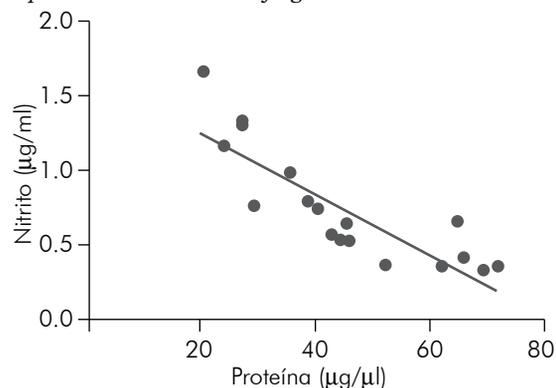
Figura 2 - Dosagem de nitrito.



C = Controle; I = Imobilizado; TA = Terapia Aquática; TAI = Terapia Aquática pós Imobilização; $p < 0,05$; * - diferente do C, TA, TAI.

Quando realizamos a correlação entre os parâmetros acima identificamos uma correlação ($p < 0,0001$) forte e negativa ($-0,852$) entre proteína e nitrito, determinando uma associação entre as variáveis estudadas (Figura 3).

Figura 3 - Correlação entre a dosagem de nitrito e o quantitativo de proteína no músculo diafragma.



Valor do Teste de Correlação de Pearson $r = -0,852$ e $p < 0,0001$.

Discussão

Nesta pesquisa, foram demonstrados os efeitos induzidos pela imobilização durante duas semanas e remobilização durante três semanas, utilizando a terapia aquática na musculatura respiratória.

O músculo diafragma apresenta uma característica de controle voluntário, mas o sistema de disparo da ação muscular advém do grupo respiratório pontino e dos grupos respiratórios dorsais e ventrais do Bulbo. Logo esse controle voluntário da musculatura respiratória é limitado. Nos animais do grupo imobilizado obtivemos uma redução do conteúdo proteico na ordem de 37,4% e um aumento do quantitativo de nitrito em relação ao grupo controle, caracterizando o quadro de atrofia muscular.

Ao longo de um período de imobilização existe atrofia da musculatura esquelética do membro imobilizado. Além disso, o indivíduo é acometido por perdas nos mais diversos segmentos e sistemas de seu organismo [20], como transtornos de inervação, circulação, comprometimento ósseo, alterações ligamentares, aumento de tecido conjuntivo, edema e rigidez articular [21].

Estes resultados obtidos no diafragma concordam com os dados de trabalhos anteriores em relação ao músculo esquelético submetido à imobilização, os quais afirmam que a atrofia muscular caracteriza-se pela redução do tamanho da fibra muscular [9-11,22], área de secção transversa e conteúdo de proteínas [10,22], redução da potência muscular, maior fadigabilidade e aumento da resistência à insulina. Sabe-se que a diminuição da síntese e o aumento da degradação proteica envolvidas neste processo contribuem para a perda total de proteína muscular devido ao desuso [22].

Nos animais que foram submetidos apenas a terapia aquática, evidenciamos um aumento no conteúdo proteico

em relação ao grupo controle de 44,2%, evidenciando um maior desenvolvimento muscular em função da prática da atividade física.

A terapia aquática é um dos recursos fisioterapêuticos que utiliza os efeitos físicos, fisiológicos e cinesiológicos advindos da imersão do corpo em água aquecida como recurso auxiliar de reabilitação ou prevenção de alterações funcionais. As propriedades físicas da água e o aquecimento desempenham um papel importante na melhoria e na manutenção da função muscular [23].

As forças físicas da água, agindo sobre um organismo imerso, provocam amplas alterações fisiológicas afetando quase que todos os sistemas do organismo. Os efeitos podem somar-se aos desencadeados pela prática de exercícios físicos na água, tornando as respostas mais complexas [24]. Provavelmente, a pressão que a água exerceu sobre a caixa torácica dos animais provocou uma maior necessidade de esforço da musculatura respiratória, com conseqüente ganho de massa muscular e do conteúdo proteico total evidenciado em nosso estudo.

As alterações no sistema respiratório ocorrem pela ação da pressão hidrostática de duas maneiras diferentes: aumento de volume central; compressão da caixa torácica e abdome. O centro diafragmático desloca-se cranialmente, a pressão intratorácica aumenta de 0,4 mmHg para 3,4 mmHg e a pressão nos grandes vasos aumenta de 3,0 mmHg a 5,0 mmHg a 12 mmHg a 15 mmHg. Estas alterações promovem um aumento do trabalho respiratório e a alteração da dinâmica respiratória [25].

Dois semanas de imobilização seguidas de três semanas de recuperação dos animais através da terapia aquática foram capazes de normalizar a musculatura respiratória, já que o grupo TAI mostrou-se igual ao grupo controle tanto no conteúdo proteico e nos valores do nitrito, o que nos leva a afirmar que a terapêutica empregada foi capaz de reverter o quadro danoso gerado pela imobilização no diafragma.

Estudos demonstram que as fibras musculares esqueléticas apresentam uma grande plasticidade, ou seja, têm a tendência de assumir um comprimento novo após as forças externas. O efeito plástico é garantido através das propriedades que os tecidos contráteis e não contráteis possuem em adquirir novos comprimentos na presença ou ausência de novas forças mecânicas [26].

A relação direta entre o aumento de nitrito e a redução de proteína no músculo diafragma pode refletir uma orientação de via metabólica, indicando um aumento na degradação muscular do diafragma, o que compromete o sistema respiratório. A perda de componentes básicos do tecido em virtude de um processo de imobilização pode repercutir negativamente nas funções teciduais básicas de diversas estruturas [27], inclusive na função respiratória.

Conclusão

Os animais do grupo terapia aquática pós-imobilização apresentaram normalização no conteúdo e degradação de

proteínas em relação ao controle. Fato evidenciado pela igualdade do quantitativo das proteínas e de seu produto de degradação (nitrito). Isso nos leva a afirmar que a terapêutica empregada foi capaz de reverter o quadro danoso gerado pela imobilização no diafragma.

Agradecimentos

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Referências

1. Caierão QM, Teodori RM, Minamoto VB. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. *Fisioter Mov* 2007;20(3):87-92.
2. Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization: a review. *J Sports Med* 1990;10(1):42-58.
3. Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Oishi J, Salvini TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(12):1853-61.
4. Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat* 1984;138(Pt 2):343-50.
5. Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensão A, Magalhães J, Duarte J, Amado F. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto* 2004;4(3):94-111.
6. Goldberg A. Influence of insulin and contractile activity on muscle size and protein balance. *Diabetes* 1979;28(Suppl 1):18-24.
7. Wasserman DH, Vranic M. Interaction between insulin and counter-regulatory hormones in control of substrate utilization in health and diabetes during exercise. *Diabetes Metab Rev* 1986;1:359-84.
8. Carson JA. The regulation of gene expression in hypertrophying skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 1997; 25:301-20.
9. Booth FW. Effect of immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1982;52(2):1113-8.
10. Falempin M, Mounier Y. Muscle atrophy associated with microgravity in rat: basic data for countermeasures. *Acta Astronautica* 1998;42:489-502.
11. Machida S, Booth FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Méd Sci. Sports Exerc* 2004;36(1):52-59.
12. Hortobágyi T, Dempsey L, Fraser D, Zheng D, Hamilton G, Lambert J, et al. Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol* 2000;524(1):293-304.
13. Norman TL, Bradley-Popovich G, Clovis N, Cutlip RG, Bryner RW. Aerobic exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hind limb suspension model. *Aviat Space Environ Med* 2000;71:593-8.
14. Rocha MND. Propriedades mecânicas do músculo esquelético de ratos wistar pós-imobilização e exercício físico em esteira [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
15. Booth FW, Kelso JR. Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *J Appl Physiol* 1973;34(3):404-6.

16. Itai Y, Kariya Y, Hoshino Y. Morphological changes in rat hind limb muscle fibers during recovery from disuse atrophy. *Acta Physiol Scand* 2004;181:217-24.
17. Santos-Júnior FFU, Alves JSM, Machado AAN, Carlos PS, Ferraz ASM, Barbosa R, et al. Alterações morfométricas em músculo respiratório de ratos submetidos à imobilização de pata. *Rev Bras Med Esp* 2010;16(3):215-8.
18. Frateschi MMEBJ. Efeitos da imobilização e remobilização em algumas propriedades mecânicas do osso [Dissertação]. Ribeirão Preto: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de química de São Carlo- Universidade de São Paulo; 2002.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;7(72):248-54.
20. Dittmier DK, Teasell R. Complications of Immobilization and bed rest. Part 1: Musculoskeletal and cardiovascular complications. *Can Fam Physician* 1993;3:1428-37.
21. Carvalho LC, Shimano AC, Picado CHF. Estimulação elétrica neuromuscular e o alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado. *Acta Ortop Bras* 2008;16(3):161-4.
22. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses* 2007;69:310-21.
23. Candeloro JM, Caromano FA. Efeitos de um programa de hidroterapia na flexibilidade e na força muscular de idosas. *Rev Bras Fisioter* 2007;11(4):303-9.
24. Caromano FA, Nowotny JP. Princípios físicos que fundamentam a hidroterapia. *Fisioter Bras* 2002;3(6):1-9.
25. Caromano FA, Filho MRFT, Candeloro JM. Efeitos fisiológicos da imersão e do exercício na água. *Fisioter Bras* 2003;4(1):1-5.
26. Rocha WA, Gobbi GA, Araujo VF, Santuzzi CHI, Coutinho GCI, Nogueira BVI, et al. Washington Luiz Silva Gonçalves et al. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membros posterior. *Rev Bras Med Espor* 2010;16(6):450-54.
27. Aquino CF, Viana SO, Fonseca ST. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e à imobilização. *Fisioter Mov* 2005;18(2):35-43.