

Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício 2018;17(2):113-8

ARTIGO ORIGINAL

Análise longitudinal do músculo sóleo de ratos submetidos à remobilização por subida em escada

Longitudinal analysis of the soleus muscle of rats submitted to remobilization by stair climbing

Vinícius Baretta*, Thiago Fernando Mattjie, Ft.**, Tatiane Kamada Errero*, Giovanni Bernardino*, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, D.Sc.***, Rose Meire Costa Brancalhão, D.Sc.****, Gladson Ricardo Flor Bertolini*****

Acadêmico (a) do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), **Unioeste, *Professora da graduação em Fisioterapia e do Mestrado em Biociências e Saúde da Unioeste, ****Professora do Mestrado em Biociências e Saúde da Unioeste, *****Professor da graduação em Fisioterapia e do Mestrado em Biociências e Saúde da Unioeste*

Recebido em 16 de maio de 2018; aceito em 30 de junho de 2018.

Endereço de correspondência: Gladson Ricardo Flor Bertolini, Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, 85819-110 Cascavel PR, E-mail: gladson_ricardo@yahoo.com.br; Thiago Fernando Mattjie: thiago.mattjie@hotmail.com; Tatiane Kamada Errero: tatiane.kamada@hotmail.com; Giovanni Bernardino: giovanni.bernardino@hotmail.com; Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro: lucineia.cr@gmail.com; Rose Meire Costa Brancalhão: rosecb@gmail.com; Rose Meire Costa Brancalhão: rosecb@gmail.com

Resumo

Exercícios de fortalecimento muscular e alongamentos são amplamente utilizados para se descobrir um melhor protocolo pós-imobilização. O objetivo desta pesquisa foi verificar a interferência de protocolos de exercícios com subida de escada, no comprimento muscular e quantidade de sarcômeros em série ao longo do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização. Para tanto, foram utilizados 32 ratos machos, distribuídos em: GA: animais somente imobilizados e eutanasiados; GB: ratos imobilizados e com remobilização livre; GC: remobilizados com subida em escada sem peso, e realizadas 40 repetições e GD: remobilizados com subida, semelhante à GC, porém foram realizadas 60 repetições. Os animais foram imobilizados com o músculo sóleo esquerdo em encurtamento, e após imobilização, aos grupos GC e GD foi aplicado o protocolo acima descrito. Após 24 horas do término do experimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados, e o músculo sóleo esquerdo dissecado e processado para estudo histológico longitudinal. As comparações foram realizadas com ANOVA unidirecional e pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A partir destas análises pode ser constatado que o protocolo de subida em escada com menos repetições foi o mais efetivo na remobilização.

Palavras-chave: imobilização, exercício, sistema musculoesquelético.

Abstract

Muscle strengthening exercises and stretching are widely used to discover a better post-immobilization protocol. The objective of this research was to verify the interference of exercise protocols with stair climbing, muscular length and quantity of sarcomeres in series along the soleus muscle of rats submitted to immobilization. For this, 32 male rats were used, distributed in: GA: animals only immobilized and euthanized; GB: immobilized rats and with free remobilization; GC: remobilized with ascending ladder without weight, and performed 40 repetitions and GD: remobilized with rise, similar to GC, however, 60 repetitions were performed. The animals were immobilized with the left soleus muscle in shortening, and after immobilization, the protocol described above was applied to the GC and GD groups. After 24 hours at the end of the experiment, the animals were anesthetized and euthanized, and the left soleus muscle was dissected and processed for longitudinal histological study. The comparisons were performed with one-way ANOVA and Tukey's post-test, with a significance level of 5%. From these analyzes it can be verified that the stair climbing protocol with less repetitions was the most effective in remobilization.

Key-words: immobilization, exercise, musculoskeletal system.

Introdução

O músculo é o mais mutável dentre os tecidos biológicos e responde às demandas normais ou alteradas com adaptações morfológicas e funcionais, estas adaptações ocorrem tanto para os estímulos positivos, que fortalecem o músculo, como também à falta destes [1-3].

Tais adaptações também afetam a regulação da quantidade de sarcômeros em série. Quando os músculos permanecem imobilizados em posição alongada há um aumento da quantidade de sarcômeros em série, atrofia moderada ou ausente, e quando imobilizadas em posição encurtada, há uma diminuição da quantidade de sarcômeros em série, e perda da extensibilidade do tecido, essas mudanças já ocorrem após duas semanas de imobilização [4,5]; alterações no tecido conjuntivo são observadas nos músculos imobilizados, havendo aumento do tecido conectivo, levando a uma maior rigidez do tecido [6,7].

Mesmo conhecendo-se todos os efeitos lesivos da imobilização, ela é um tratamento frequentemente utilizado para lesões do sistema musculoesquelético [8,9], os processos de recuperação do músculo imobilizado e os métodos de remobilização não são, ainda, bem esclarecidos, sendo fonte para várias pesquisas. A forma mais comum de remobilização é por meio do exercício físico [10,11]. São estudados vários tipos de procedimentos visando identificar a contribuição mais efetiva na recuperação da musculatura debilitada devido à imobilização, utilizando exercícios de fortalecimento muscular e alongamentos [5], assim denota-se a importância em se estudar a contribuição destes exercícios para a recuperação do tecido muscular debilitado pela imobilização prolongada. No presente estudo hipotetizou-se que efeitos deletérios produzidos pela imobilização em posição de encurtamento do músculo sóleo, com relação aos sarcômeros em série, poderiam ser amenizados com o uso de exercícios físicos. Por isso, este estudo teve como objetivo verificar a interferência de protocolos de exercícios com escada, no comprimento muscular e quantidade de sarcômeros em série ao longo do músculo sóleo.

Material e métodos

Para o presente estudo, foram utilizados 32 ratos machos, da linhagem Wistar, com idade de 10 semanas, os quais foram obtidos no Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas de polipropileno, com acesso a água e ração ad libitum, temperatura ambiente controlada em 25°C e fotoperíodo claro/escuro de 12 horas. O estudo foi conduzido segundo as Normas Internacionais de Ética na Experimentação Animal, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Unioeste.

No início do experimento os animais foram pesados e identificados. Em seguida, separados em 4 grupos:

GA (controle total – n=8): os animais desse grupo foram apenas submetidos à imobilização e eutanasiados após a retirada da imobilização;

GB (controle com remobilização livre – n=8): neste grupo os animais foram imobilizados e remobilizados de forma livre, sem nenhuma intervenção de tratamento;

GC (remobilização com exercício de escada, 40 repetições – n=8): neste grupo os animais foram imobilizados e remobilizados com exercícios de fortalecimento muscular, feitos por meio de subida em uma escada; com série de 40 repetições.

GD (remobilização com exercício de escada, 60 repetições – n=8): os animais foram imobilizados e remobilizados com exercícios de fortalecimento muscular, semelhante à GC, porém foram realizadas 60 repetições.

Protocolo de imobilização

Para realizar o procedimento de imobilização, os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). O aparato de imobilização visava obter o encurtamento do músculo sóleo esquerdo. A articulação tibiotársica foi imobilizada em máxima flexão plantar com gesso, baseado em modelo proposto na literatura [12]. Os animais eram observados diariamente, devido à possibilidade de ocorrer

danos no aparato de imobilização, e permaneceram com o membro pélvico esquerdo imobilizado por um período de duas semanas.

Protocolo de exercício

O protocolo de exercício foi realizado em uma escada com as seguintes dimensões: 1,10m de altura, largura de 25cm. Na extremidade superior da escada foi colocada uma caixa preta, preenchida com cepilho e ração, para estimular a subida dos animais. Os grupos GC e GD realizaram treinamento de subida, por uma semana prévia à imobilização, para adaptação; e posteriormente foi aplicado o protocolo que consistia em duas séries de 20 repetições, (totalizando 40 repetições), em GC, e três séries de 20 repetições, (totalizando 60 repetições), em GD [13].

Confecção de lâminas histológicas

Após 24 horas do término do experimento, os animais foram anestesiados e os músculos sóleos esquerdos dissecados e gotejados com solução fisiológica de NaCl (0,9%); os animais foram, então, submetidos a eutanásia por decapitação em guilhotina. Posteriormente, os músculos foram posicionados sobre papel-alumínio, no comprimento de repouso, e avaliado o maior comprimento, por meio de paquímetro. Posteriormente, imersos em solução de formol (10%) por 3h, após este período o mesmo foi seccionado longitudinalmente, e a parte lateral colocada em ácido nítrico (30%) para hidrólise do tecido conjuntivo, permanecendo neste por 72h, sendo, em seguida, armazenados em solução de glicerol (50%).

Para a confecção das lâminas histológicas, as fibras musculares foram isoladas com uso de pinças com pontas finas, colocando-se o músculo em uma placa de Petri e visualização com auxílio de lupa. Após a retirada das fibras, estas foram montadas em lâmina histológica contendo verniz; e protegidas com uma lamínula para posterior observação em microscópio de luz.

Para a análise longitudinal, foi realizada a quantificação do número de sarcômeros ao longo de 300 μm , em uma fibra muscular. Em todas as lâminas foram analisadas cinco fibras, por meio da contagem de sarcômeros em seis campos distintos de 50 μm , totalizando os 300 μm por fibra. Para realizar a análise, utilizou-se microscópio de luz comum (Olympus), com objetiva de 10 vezes, as imagens foram digitalizadas e posteriormente, a partir de regra de três simples, estimou-se a quantidade de sarcômeros em série ao longo de uma fibra muscular; em seguida, realizou-se a estimativa do comprimento de cada sarcômero, dividindo a quantidade encontrada na fibra pelo comprimento da mesma.

Análise estatística

Inicialmente a normalidade foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, constatada a normalidade dos mesmos, os dados foram apresentados por média e desvio-padrão, com comparações entre grupos por ANOVA unidirecional, com pós-teste de Tukey, em todos os casos o nível de significância foi de 5%. Para os cálculos foi utilizado o programa Bioestat 5.0.

Resultados

Os resultados apontam que não houve diferenças para o comprimento muscular, mas houve para as outras variáveis. GC apresentou maior número de sarcômeros em 300 μm ao comparar com GA e GB, mas não se refletiu na estimativa de sarcômeros ao longo da fibra muscular. Com relação ao tamanho dos sarcômeros, GA apresentou valores significativamente maiores ao comparar com GC e GD (tabela I).

Tabela I - Resultado referente às variáveis analisadas em todos os grupos.

	GA	GB	GC	GD
Comprimento muscular (cm)	2,29	2,45	2,33	2,25
Quantidade de sarcômeros em 300 µm	113,33*	129,6*	154	133,8
Estimativa de sarcômeros ao longo da uma fibra	8.818,15	10.571,45	9.946,67	9.987,59
Tamanho do sarcômero (µm)	2,67	2,33	1,96**	2,26**

(*) Diferença significativa nos grupos GA e GB quando comparados ao GC; (**) Diferença significativa nos grupos GC e GD quando comparados ao GA.

Discussão

Os dados apontam que GA foi o grupo que apresentou menor quantidade de sarcômeros em série em 300 µm, porém apresenta seus sarcômeros em maior tamanho, quando comparado aos outros grupos. Tendo em vista que a imobilização do músculo foi em encurtamento, esse ajuste provavelmente aconteceu para que ocorresse sobreposição ideal dos filamentos de actina e miosina, o que permitiria um bom desenvolvimento de tensão durante as contrações [14], ainda, segundo os autores, essa adaptação do número de sarcômeros é necessária, uma vez que os filamentos de miosina e actina possuem comprimento constante, sendo assim, a maneira de causar sobreposição ótima dessas estruturas é alterando o número dos sarcômeros. O que pode explicar o efeito inverso de GA, ocorrer em GC, em que se tem uma maior quantidade de sarcômeros em 300 µm, porém, com um menor tamanho, sugere-se que essa mudança seja proveniente do protocolo de subida em escada, em que a musculatura necessitou adaptar-se para tolerar os exercícios realizados. O mesmo ocorreu em GD, porém com uma leve diminuição na contagem de sarcômeros.

Não houve nenhuma diferença significativa envolvendo os dois grupos submetidos à realização de exercícios (GC e GD), porém os resultados foram mais expressivos, quando comparados a GA, no grupo que realizou o protocolo com a subida em escada com menor número de repetições, pois apresenta um maior número de sarcômeros em 300 µm.

Lima *et al.* [14] citam que o curto período de imobilização utilizado em seu estudo, de apenas uma semana, foi suficiente para causar adaptações morfométricas e mecânicas, em relação à quantidade de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular, baseado nisso, pode-se dizer que o mesmo vale para o presente estudo, visto que o protocolo utilizado foi de maior tempo.

A atrofia muscular causada pela imobilização é alvo de vários estudos, sendo mostrado, por meio de análise transversal de músculos de ratos submetidos à imobilização por diferentes períodos, que esta pode causar, além de alterações longitudinais [5], também na área de secção transversa do músculo [11,15,16], que está associada ao aumento da área de tecido conjuntivo presente em seu envoltório [6].

Salienta-se que o estudo da imobilização, e de protocolos para uma melhor reabilitação, envolve não só o tecido muscular mas todo o aparelho locomotor (sistemas articular e ósseo), portanto, para a elaboração de protocolos eficientes, em remobilização, todos os tecidos afetados devem ser criteriosamente analisados [17]. Desta forma, Lima *et al.* [14], discutem a importância do conhecimento das propriedades elásticas de um tecido para os profissionais de reabilitação, pois, segundo os autores, este conhecimento auxilia no diagnóstico, tratamento e prevenção de lesões esportivas e ortopédicas.

Assim, vê-se que são necessários mais estudos que envolvam a imobilização, com aplicação de diferentes protocolos e análise dos diferentes tecidos que envolvam o sistema musculoesquelético, para que, a partir disso, sejam elaboradas melhores formas de tratamento na prática clínica reabilitativa.

Conclusão

Conclui-se que o protocolo mais leve de remobilização com subida em escada teve efeito significativo e positivo no músculo sóleo de ratos, considerando-se a quantidade de

sarcômeros em série aumentada, em relação aos grupos que não foram remobilizados ou fizeram apenas remobilização livre.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do estudo por meio de bolsas de iniciação científica (PIBIC).

Referências

1. Spagnol AR, Malheiro OCM, Castoldi RC, Moret DG, Araújo RG de, Papoti M et al. Análise da plasticidade muscular de ratos submetidos a um protocolo de treinamento físico concorrente. *Rev Bras Ciênc Mov* 2012;20(3):118-24.
2. Freitas GR, Santo CCE, Machado-Pereira NAMM, Bobinski F, Santos ARS, Ilha J. Early cyclical neuromuscular electrical stimulation improves strength and trophism by Akt pathway signaling in partially paralyzed biceps muscle after spinal cord injury in rats. *Phys Ther* 2018;98(3):172-81.
3. Schild M, Ruhs A, Beiter T, Zügel M, Hudemann J, Reimer A et al. Basal and exercise induced label-free quantitative protein profiling of m. vastus lateralis in trained and untrained individuals. *J Proteomics* 2015;122:119-32.
4. Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol* 1972;224(1):231-44.
5. Artifon EL, Ferrari D, Cunha DM, Nascimento CM, Ribeiro LFC, Bertolini GRF. Effects of therapeutic ultrasound associated with static stretching on longitudinal histomorphometric parameters of immobilized soleus of rats. *Rev Bras Med Esporte* 2012;18(5):341-4.
6. Kunz RI, Coradini JG, Soares CLR, Brancalhão RMC, Bertolini GRF, Ribeiro LFC. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. *Publ UEPG Ciências Biol e da Saude* 2013;19(2):123-9.
7. Itaya N, Yabe Y, Hagiwara Y, Kanazawa K, Koide M, Sekiguchi T et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound for preventing joint stiffness in immobilized knee model in rats. *Ultrasound Med Biol* 2018;44(6):1244-56.
8. Mitchell CJ, D'Souza RF, Mitchell SM, Figueiredo VC, Miller BF, Hamilton KL et al. The impact of dairy protein during limb immobilization and recovery on muscle size and protein synthesis; a randomized controlled trial. *J Appl Physiol* 2018;124(3):717-28.
9. Bahador R, Mirbolook A, Arbab S, Derakhshan P, Gholizadeh A, Abedi S. The relation between reflex sympathetic dystrophy syndrome and trauma severity in patients with distal tibia fracture. *Trauma Mon* 2016;21(2):4-7.
10. Kodama FY, Camargo RCT, Job AE, Ozaki GAT, Koike TE, Camargo Filho JCS. Propriedades mecânicas do músculo de ratos adultos e idosos, exercitado pós-imobilização. *Acta Ortop Bras* 2012;20(4):218-22.
11. Kunz RI, Coradini JG, Silva LI, Kakiyama CMM, Brancalhão RMC, Bertolini GRF, et al. Morfologia dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos Wistar imobilizados e remobilizados em meio aquático. *Conscientiae Saúde* 2014;13(4):595-602.
12. Matheus JPC, Gomide LB, Oliveira JGP, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Rev Bras Med Esporte* 2007;13(34):55-9.
13. Speretta GFF, Rosante MC, Duarte FO, Leite RD, Lino ADDS, Andre RA et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(12):1469-77.
14. Lima S, Caierão Q, Durigan J, Schwarzenbeck A, Silva C, Minamoto V et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. *Rev Bras Fisioter* 2007;11(4):297-302.
15. Bertolini SMMG, Oliveira PD, Cararo DC. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos da linhagem wistar pós-imobilização articular. *Acta Sci - Heal Sci* 2010;32(1):23-7.
16. Demangel R, Treffel L, Py G, Briocche T, Pagano AF, Bareille MP et al. Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model. *J Physiol* 2017;595(13):4301-15.

17. Kunz R, Coradini J, Silva L, Bertolini G, Brancalhão R, Ribeiro L. Effects of immobilization and remobilization on the ankle joint in Wistar rats. *Brazilian J Med Biol Res* 2014;47(10):842-9.