

Efeitos da Remobilização em Duas Semanas com Natação Sobre o Músculo Sóleo de Ratos Submetidos à Imobilização



Effects of Remobilization in Two Weeks of Swimming on the Soleus Muscle of Rats Submitted to Immobilization

Fabielle Sant'Ana Volpi¹
Luana Muriel Casarolli¹
Claudia Pudell¹
Thiago Menon¹
Adriano Policam Ciena¹
Éder Paulo Belato Alves¹
Gladson Ricardo Flor Bertolini¹

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Endereço para correspondência:
Gladson Ricardo Flor Bertolini – Rua Luiz Vilwoc, 125. B – Nova Cidade – Cascavel – Paraná – CEP 85803-177
Email: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Submetido em 29/03/2007
Versão final recebida em 01/11/2007
Aceito em 09/12/2007

RESUMO

Uma importante questão para a reabilitação é como proteger o músculo esquelético dos efeitos da imobilização, pois, o músculo é o mais mutável dentre os tecidos biológicos e responde às demandas normais ou alteradas com adaptações morfológicas e funcionais. O objetivo deste artigo foi verificar o efeito de duas diferentes intensidades de carga de natação sobre a morfologia do músculo sóleo, e se são eficazes para reverter o processo de atrofia causado pela imobilização durante o período de 15 dias. Foram utilizados 10 ratos, com idade de 10 ± 2 semanas, divididos em 2 grupos: G1 (imobilização/natação sem peso) e G2 (imobilização/natação com sobrecarga de 10% do peso corporal). Dentro das variáveis analisadas ao comparar o membro esquerdo (submetido à imobilização) com o direito (não submetido) foram observados: para peso muscular em G1 = -20,55% ($p=0,0344$) e G2 = -17,02% ($p=0,0053$); comprimento muscular em G1 = -10,66% ($p=0,0011$) e G2 = -6,55% ($p=0,1016$); estimativa de sarcômeros em série no músculo para G1 = -14,18% ($p=0,0101$) e G2 = -10,99% ($p=0,0043$); e para comprimento de sarcômeros em G1 = 3,51% ($p=0,3989$) e G2 = 5,28% ($p=0,1771$). Conclui-se que duas semanas de remobilização através da natação, com diferentes tipos de sobrecarga não foram suficientes para reverter totalmente o processo de atrofia causado pela imobilização.

Palavras-chave: músculo esquelético, sarcômeros em série, atrofia muscular, imobilização, exercícios.

ABSTRACT

An important issue in rehabilitation is how to protect the skeletal muscle from immobilization effects, since it is the most changeable tissue amongst the biological tissues and responds to normal or modified demands with morphological and functional adaptations. The objective of this paper was to check the effect of two different swimming load intensities on the morphological properties of the soleus muscle, and if the different degrees of swimming are effective to reverse the process of atrophy caused by immobilization during 15 days. Ten rats, 10 ± 2 weeks were used and divided in 2 groups: G1 (immobilization/swimming without overload) and G2 (immobilization/swimming with 10% overload). Within the variable analyzed, when the left limb (submitted to immobilization) was compared with the right limb (not submitted) it was observed: for muscle weight G1 = -20.55% ($p=0.0344$) and G2 = -17.02% ($p=0.0053$); for muscle length G1 = -10.66% ($p=0.0011$) and G2 = -6.55% ($p=0.1016$); for serial sarcomere estimate G1 = -14.18% ($p=0.0101$) and G2 = -10.99% ($p=0.0043$); and sarcomere length G1 = 3.51% ($p=0.3989$) and G2 = 5.28% ($p=0.1771$). It has been concluded that two weeks of remobilization through swimming, with different degrees of overload, were not sufficient to reverse the atrophy process caused by immobilization.

Keywords: skeletal muscle, serial sarcomere, muscle atrophy, immobilization, exercise.

INTRODUÇÃO

Uma importante questão para a reabilitação é como proteger o músculo esquelético dos efeitos da imobilização, pois, o músculo é o mais mutável dentre os tecidos biológicos e responde às demandas normais ou alteradas com adaptações morfológicas e funcionais^(1,2).

O músculo se adapta a alterações em seu comprimento por meio da regulação do número de sarcômeros em série, quando imobilizados em posição de alongamento mostram um aumento do número de sarcômeros em série, atrofia moderada ou ausente e não há mudanças significativas no tecido conjuntivo. Esse aumento do número de sarcômeros, e conseqüente aumento do tamanho do músculo, ocorre principalmente nas duas regiões terminais das fibras musculares^(1,3).

Em contraste, quando o músculo é mantido imobilizado em po-

sição encurtada, pode diminuir o comprimento e a extensibilidade. A perda de sarcômeros em série, em músculos imobilizados em encurtamento, ocorre principalmente após duas semanas de imobilização⁽⁴⁾.

A redução do número de sarcômeros em série é uma resposta às variações do tamanho funcional ideal do sarcômero, que afeta a função normal deste. Esse processo ocorre como um meio de manter o sarcômero no tamanho ótimo para o desempenho de suas funções⁽⁵⁾.

Além da redução do número de sarcômeros em série, ocorre também atrofia da fibra muscular por desuso e conseqüente diminuição da atividade contrátil do músculo e perda de força como uma característica funcional da hipotrofia⁽²⁾.

Mesmo conhecendo-se todos os efeitos lesivos da imobilização, ela é um tratamento freqüentemente utilizado para lesões do sistema músculo esquelético⁽⁶⁻⁸⁾. A recuperação do músculo começa dentro

de três a cinco dias após o início de um programa de exercícios⁽²⁾, porém o conhecimento sobre o efeito da remobilização sobre tecidos músculo-esqueléticos permanece não totalmente esclarecido sendo o conhecimento desse assunto ainda fonte de pesquisas.

Segundo Harrelson⁽⁹⁾, não é conhecido se todos os efeitos lesivos, de uma imobilização prolongada sobre os tecidos, podem ser totalmente revertidos com técnicas de remobilização. Porém, são necessários estudos que indiquem quais as técnicas mais eficientes para a recuperação funcional e morfológica do músculo, mais próxima ao normal.

O objetivo deste artigo foi verificar o efeito de duas diferentes intensidades de carga de exercícios de natação sobre a morfologia do músculo sóleo, e se são eficazes para reverter o processo de atrofia causado pela imobilização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 10 ratos, machos da raça Wistar, com idade de 10±2 semanas, obtidos no Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com livre acesso à água e ração *ad libitum*. O estudo foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal⁽¹⁰⁾.

Foram divididos em dois grupos, distribuídos aleatoriamente, com cinco animais cada: G1 (imobilização/natação sem peso) e G2 (imobilização/natação com sobrecarga de 10% do peso corporal). No início do experimento os animais foram pesados e identificados.

O grupo 1 foi submetido à imobilização em plantiflexão da pata posterior esquerda por 15 dias, através de um dispositivo desenvolvido por Coutinho et al.⁽¹¹⁾, em posição de encurtamento do músculo sóleo. Os animais eram diariamente observados devido à possibilidade de danos ao aparato de imobilização. Ao encerrar esse período, a imobilização foi retirada e os animais foram submetidos à natação, em reservatório de água de 1000 litros, circular, fabricado em plástico, com profundidade de 50 cm, com a temperatura da água mantida entre 25° e 27° C, cinco vezes por semana, 10 min por dia, no período vespertino, durante 2 semanas.

Para G2, após o período de imobilização, o protocolo de natação foi semelhante à G1, porém com sobrecarga de 10% do peso corporal. Para a natação com sobrecarga, foram utilizados pesos de chumbo acoplados a uma tira de velcro, a qual foi posicionada no tórax do animal, visando não prejudicar a movimentação. Prévio ao treinamento, todos os animais foram novamente pesados antes do início da natação, para que desta forma fosse estabelecida a quantidade de peso utilizada como sobrecarga.

Terminada a fase experimental os animais foram pesados e sacrificados através de guilhotina, com prévia anestesia intraperitoneal de xilazina (12mg/kg) e quetamina (95mg/kg). Posteriormente foram dissecados os músculos sóleos das patas direita e esquerda. Após a retirada dos músculos, estes foram limpos de tecido conjuntivo excedente e gordura, pesados em balança analítica e fixados em placas de isopor para serem medidos em seu comprimento de repouso através de paquímetro. Então, foram colocados em formol 10% durante 3 horas. Após esse período foram colocados em ácido nítrico 30% por 48 h visando quebra do tecido conjuntivo e, sendo em seguida armazenados em solução de glicerol 50%.

Foram retiradas 5 fibras musculares isoladas de tendão a tendão e montadas em lâmina histológica, para a contagem do número de sarcômeros no decorrer de 50 µm em 6 campos não consecutivos, totalizando 300 µm. A contagem do número de sarcômeros foi realizada sempre pelo mesmo examinador, visando evitar tendências, em um monitor de 29 polegadas, previamente calibrado. O cálculo utilizado para estimar o total de sarcômeros em série na fibra foi regra de três simples.

As variáveis analisadas (peso corporal (P), peso (PM) e comprimento muscular (CM), estimativa do número de sarcômeros em série (ENSS) no músculo e comprimento médio do sarcômero (CMS)) foram avaliadas

pela comparação entre os resultados obtidos nos músculos das patas esquerdas (imobilizado e/ou remobilização através da natação) e direitas (intacto), em cada grupo experimental. Utilizou-se a estatística descritiva (porcentagem, média e desvio-padrão) e inferencial com o teste *t* de *Student* pareado, para comparações entre os grupos foi utilizado o teste *t* de *Student* não-pareado, sendo considerado diferença significativa $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso Corporal

Para os dois grupos imobilizados houve grande variação do peso corporal durante o experimento, para G1 houve variação significativa de -18,70% ($p=0,0174$) entre o valor pré-imobilização e pós-imobilização; ao comparar os valores pós-imobilização com os do final da remobilização, observou-se ganho significativo de 29,74% no peso corporal ($p=0,0004$), contudo a diferença de 5,48% entre os valores encontrados nos períodos pré-imobilização e pós-remobilização não foi significativa ($p=0,1801$). Para G2 a diferença inicial entre pré e pós-imobilização foi significativa ($p=0,0024$) em -20,23%; entre o período pós-imobilização e pós-remobilização houve aumento significativo de 39,29% ($p=0,0009$); e, ao contrário de G1, houve aumento significativo no período pré-imobilização com pós-imobilização de 11,11% ($p=0,0012$). Ao comparar entre os grupos não houve variações significativas para o período pré-imobilização ($p=0,6575$), pós-imobilização ($p=0,5740$) e pós-remobilização ($p=0,2904$) (tabela 1).

Tabela 1. Valores obtidos (apresentados em média e desvio-padrão) para o peso corporal dos animais (em gramas) de G1 e G2, nos períodos de avaliação: pré-imobilização (PRÉ-IMOB), pós-imobilização (PÓS-IMOB) e pós-remobilização (PÓS-REMOB).

	PRÉ-IMOB	PÓS-IMOB	PÓS-REMOB
G1	317,60±17,40g	258,20±21,53g	335,00±13,19g
G2	311,40±24,58g	248,40±30,57g	346,00±17,26g

Peso muscular (PM)

Para os pesos musculares do MSD e MSE de G1 houve diferença significativa ($p=0,0344$) de -20,55%; e para G2 de -17,02% ($p=0,0053$). Não houve diferenças significativas entre grupos, ao comparar MSD ($p=0,6050$) ou MSE ($p=0,5255$) (tabela 2).

Comprimento muscular (CM)

Nos comprimentos musculares dos MSD e MSE houve diferença significativa ($p=0,0011$) para G1 de -10,66%, mas não para G2 ($p=0,1016$) em -6,55%. Na comparação entre os grupos, nem MSD ($p=0,5039$), nem MSE ($p=0,0541$), variaram significativamente (tabela 2).

Estimativa do número total de sarcômeros em série (ENSS)

A ENSS apresentou diferença de -14,18% ($p=0,0101$) para G1 e -10,99% ($p=0,0043$) para G2. Novamente não houve diferenças para MSD ($p=0,8571$) e MSE ($p=0,2780$) (tabela 2).

Tabela 2. Valores encontrados (apresentados em média e desvio-padrão) para G1 e G2: peso muscular (PM) em gramas (g), comprimento muscular (CM) em centímetros (cm), estimativa do número total de sarcômeros em série (ENSS) e comprimento médio dos sarcômeros (CMS) em micrometros (µm).

		PM (g)	CM (cm)	ENSS	CMS (µm)
G1	MSD	0,1684±0,0165	2,06±0,14	10140,00±1224,00	2,05±0,18
	MSE	0,1338±0,0325	1,84±0,12	8702,00±655,80	2,12±0,05
G2	MSD	0,1733±0,0118	2,14±0,19	10260,00±704,20	2,08±0,05
	MSE	0,1438±0,0088	2,00±0,09	9132,00±502,30	2,19±0,12

Comprimento médio dos sarcômeros (CMS)

O tamanho médio dos sarcômeros mostrou variação não significativa ($p=0,3989$) de 3,51% para G1, e de ($p=0,1771$) 5,28% para G2. Entre os grupos, também não houve variação significativa para MSD ($p=0,6936$) e para MSE ($p=0,2737$).

DISCUSSÃO

Neste estudo testou-se a hipótese de que a remobilização através da natação aumentaria a taxa de recuperação da atrofia muscular após a imobilização da pata traseira. Foram utilizadas duas propostas de natação, para verificar se existiam diferenças entre exercícios de baixa e alta intensidade. A razão para a escolha do músculo sóleo foi o fato dele ser um músculo sensível a atrofia pela imobilização e responder bem ao treino físico^(6,8).

Após o período de duas semanas de imobilização pode-se observar que os animais obtiveram uma redução acentuada do peso corporal em relação ao peso inicial. Fato observado também por outros autores^(1,8,12), e que pode ser atribuído a vários fatores, como desuso e atrofia causados pela imobilização, menor ingestão de alimento pela limitação de movimento, uma possível queda na síntese de proteínas em resposta à hipotatividade ou certo grau de estresse^(5,12). Contudo, após o período de remobilização houve restauração do peso inicial para G1, e aumento do peso, comparado ao inicial, para G2, apontando para possível maior ganho de massa pelo exercício de natação realizado com sobrecarga.

Nos dois grupos houve extensa perda de peso muscular no membro submetido à imobilização. Essa perda de peso, segundo Mozdiak et al.⁽¹²⁾ ocorre porque a imobilização e o desuso induzem a uma apoptose causando redução no número de mionúcleos e do conteúdo de DNA, induzindo a uma atrofia muscular e conseqüente perda de peso. A perda de peso muscular foi semelhante nos dois grupos, fato diferente do observado por Sakakima⁽⁶⁾ e Sakakima et al.⁽⁷⁾, nos quais os grupos submetidos a exercício de média e alta intensidade foram benéficos para recuperação das alterações causadas pela imobilização. Tais resultados podem ter ocorrido pela liberação, dentro do músculo, de fatores de crescimento (IGF-I e MGF) que estimulam a proliferação e diferenciação das células satélites e como conseqüência, adição de mionúcleos e aumento na síntese protéica, revertendo o processo de perda de peso^(13,14).

Ainda assim em nenhum dos grupos submetidos à remobilização através da natação foi possível observar a recuperação completa do peso muscular, de forma contrária ao relato de Sakakima que observou após o período de remobilização, três vezes maior que o da imobilização, o peso muscular normalizado⁽⁶⁾. Este fato que pode ser explicado pelos diferentes tempos de remobilização apresentados em outros experimentos.

Em relação ao comprimento muscular, para G2 as diferenças não foram significativas ($p=0,1016$), demonstrando que apesar da diminuição em torno -6,55% comparado com o lado não submetido à imobilização, o comprimento retornou em níveis próximos ao normal, talvez devido a maior excursão da pata ao realizar a natação com sobrecarga corporal.

Segundo Willians e Goldspink⁽¹⁵⁾ a perda de sarcômeros em série nos músculos imobilizados em posição de encurtamento ocorre principalmente nas primeiras duas semanas após a imobilização. Tabary et al.⁽⁴⁾ observaram que após 4 semanas de imobilização em posição de encurtamento muscular ocorreu a diminuição em 40% do número de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular de gatos. Esse fato pode ser observado no presente estudo, no qual os grupos submetidos à imobilização apresentaram diminuição do número de sarcômeros em série, corroborando com a literatura acerca da plasticidade do sóleo ao imobilizá-lo em posição de encurtamento.

Para Koh e Tidball⁽¹⁶⁾ o aumento do número de sarcômeros em série no músculo esquelético é importante para o desenvolvimento e função muscular. Acredita-se que o estímulo mecânico esteja envolvido nesta regulação, e que este causaria a liberação de fatores de crescimento para o aumento do número de sarcômeros. Em um experimento realizado por esses autores evidenciou-se que o óxido nítrico é um modulador positivo da adição de sarcômeros em série.

No trabalho realizado por Kannus et al.,⁽⁸⁾ os animais foram submetidos à remobilização através da esteira em oito semanas. O exercício de alta intensidade gerou melhores resultados do que o de baixa intensidade. No presente estudo a sobrecarga não foi eficaz para reverter o processo de redução do número de sarcômeros em série, causado pela imobilização, contudo, salienta-se que o protocolo de exercício utilizado, pode ter sido insuficiente para a reversão da hipotrofia de sarcômeros em série, visto que os comprimentos observados para os sarcômeros não foram diferentes entre os lados e grupos. Contudo, deve-se considerar como limitação no presente estudo, a pequena quantidade de animais utilizada.

CONCLUSÕES

Com os métodos aqui empregados foi possível observar que nenhum dos grupos submetidos à remobilização através da natação atingiu a normalização dos resultados de peso muscular e estimativa de sarcômeros em série; contudo para o comprimento muscular, G2 alcançou valores estatisticamente semelhantes.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gomes Ars, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1473-80.
2. Carvalho CMM. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético [Dissertação de Mestrado em Bioengenharia]. EESC/FMRP/IQSC: Universidade de São Paulo, 2001.
3. Salvini TF. Plasticidade e adaptações posturais dos músculos esqueléticos. In: Marques AP. Cadeias Musculares: um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global. São Paulo: Manole, 2000: 3-14.
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: 231-44.
5. Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Oishi J, Salvini TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J of Med Biol Res* 2004; 37: 1853-61.
6. Sakakima, H. Effects of immobilization and subsequent low to high frequency treadmill running on rat soleus muscle and ankle joint movement. *J Phys Ther Sci* 2004; 16: 43-8.
7. Sakakima H, Yoshihiro Y, Sakae K, Morimoto N. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. *Scand J Med Sci Sports* 2004; 14: 186-92.
8. Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TPN, Kvist M, Vieno T, Jarvinen TAH, et al. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol* 1998; 84: 1418-24.
9. Harrelson GL. Fatores fisiológicos da reabilitação. In: Andrews JR, Harrelson GL, Wilk KE. Reabilitação física das lesões desportivas. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000; 13-37.
10. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik D. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP, 2004.
11. Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 1329-32.
12. Mozdiak PE, Pulvermacher PM, Schultz E. Muscle regeneration during hindlimb unloading results in a reduction on muscle size after reloading. *J Appl Physiol* 2001; 91: 183-90.
13. Adams GR, McCue SA. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* 1998; 84: 1719-22.
14. Goldspink G. Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 211-22.
15. Willians PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat* 1984; 38: 291-302.
16. Koh TJ, Tidball JG. Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *J Physiol* 1999; 519: 189-96.