

# Padrão Metabólico Muscular de Ratos Idosos e Jovens Submetidos à Imobilização Articular

## Muscular Metabolic Profile of Young and Aged Rats Submitted to Joint Immobilization

Diogo Vicente Sprícigo<sup>a\*</sup>; Carlos Alberto da Silva<sup>b</sup>; Eder João Arruda<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Universidade Metodista de Piracicaba, São Paulo, Brasil

<sup>b</sup>Programa de Mestrado em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba São Paulo, Brasil

\*E-mail: diogospricigo@hotmail.com

Recebido: 27 de junho de 2011; Aceito: 8 de setembro de 2011.

### Resumo

O artigo teve como objetivo avaliar o comportamento metabólico da musculatura de ratos jovens e envelhecidos submetidos à imobilização articular do tornozelo na posição de 90°. Foram utilizados ratos albinos Wistar com idade entre três e vinte e quatro meses distribuídos em quatro grupos experimentais (n=6), assim denominados: jovens (J), jovens imobilizados (JI), envelhecidos (E) e envelhecidos imobilizados (EI). A imobilização foi realizada no membro posterior esquerdo por órtese de resina acrílica. Após sete dias de imobilização, o músculo sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB), gastrocnêmio porção mista (GM), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) foram retirados e encaminhados para determinação das reservas glicogênicas, do peso e da relação proteína total/DNA. A avaliação estatística foi utilizada pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido de ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%. No grupo jovem, a imobilização promoveu redução no conteúdo glicogênico, assim representado: (S:40%, GB:30%, GM:59,5%, ELD:29,4%, TA:50%). Por sua vez, no grupo envelhecido, as alterações nas reservas energéticas foram mais significativas atingindo 64% no S, 51% no GB, 47% no GM, 48,8% no ELD, 48,6% no TA. Com relação ao peso houve redução de 31% no JI e 37% no EI; na relação proteína total/DNA o grupo jovem imobilizado apresentou redução de 20% no S, 49,5% no GB, 32,6% no GM, 20% no ELD e 16% no TA. Cabe ressaltar que no grupo envelhecido a redução foi mais significativa atingindo em média 60%. As respostas desencadeadas pela imobilização no músculo esquelético envelhecido foram mais significativas sugerindo cuidados especiais na prática fisioterapêutica aplicada aos idosos.

**Palavras-chave:** Glicogênio. Imobilização. Músculo Esquelético.

### Abstract

*This paper aims to evaluate the skeletal metabolic behavior of musculature in young and aged Wistar rats were submitted to joint immobilization of ankle at 90° for 7 days. Male Wistar rats between 3 and 24 months old were distributed in 4 experimental groups (n=6), called: young (Y), young immobilized (YI), aged (A) and aged immobilized (AI). The left hind limb was immobilized using of an acrylic resin orthosis. After seven days of immobilization, the soleus muscle (S), white gastrocnemius (WG), mixed gastrocnemius (RG), extensor digitorum longus (ELD) and tibialis anterior (TA) were removed and used to determinate the glycogen reserves, weight and the total protein/DNA rate. The statistical analysis was used through the test of Kolmogorov-Smirnov, followed by ANOVA and Tukey, with  $p < 0,05$ . In the young group, the immobilization promoted significant reduction in glycogen storage, represented by 40% in S, 30% in WG, 59,5% in RG, 29,4% in ELD and 50%, in TA. On the other hand, in the aged group, the modifications were more significant, reaching 64% in S, 51% in WG, 47% in RG, 48,8% in ELD, and 48,6% in TA. Concerning weight there was reduction of 31% in YI, and 37% in AI; in the relation total protein/DNA, the immobilized young group showed reduction of 20% in S, 49,5% in WG, 32,6% in RG, 20% in ELD, and 16% in TA. It is important to enhance that in the aged group there was greater reduction that reached 60%. The responses triggered by the skeletal muscle immobilization were more significant, suggesting special care in physiotherapy practice applied to the elderly.*

**Keywords:** Glycogen. Immobilization. Muscle, Skeletal.

## 1 Introdução

Fraturas ósseas, rupturas ligamentares, lesões musculares, doenças degenerativas, bem como as articulares, podem exigir, após cirurgia ou tratamento conservador, imobilização dos membros, comumente realizada por meio da aplicação de aparelho gessado<sup>1</sup>.

Na literatura há diferentes modelos experimentais aplicados ao estudo de desuso muscular com especial atenção à denervação, à tenotomia, à suspensão de membro (microgravidade) e à imobilização articular. Os modelos de imobilização em particular se diferem quanto ao período, posição articular e material utilizado, no entanto, há consenso

quanto ao desenvolvimento de hipotrofia<sup>2</sup>.

A plasticidade histo-fisiológica das fibras musculares esqueléticas permite que estas sejam capazes de adaptar constantemente sua funcionalidade deflagrando mudanças no seu tamanho ou no tipo de fibra<sup>3</sup>. Com relação à hipotrofia muscular induzida por desuso é sabido que decorre de uma gama de efeitos deletérios, tais como, redução da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga<sup>4</sup>. Parte desse efeito pode ser atribuída a fatores neurais<sup>5</sup>. Há evidências de que ocorre uma disfunção reversível na transmissão neuromuscular, somando-se a diminuição na área de secção transversa provocadas pelas alterações tróficas<sup>6</sup>. No perfil metabólico, é sabido que o desuso muscular crônico

e a imobilização são condições que diminuem a eficiência das vias sinalizadoras da insulina, induzindo o quadro de resistência insulínica<sup>7</sup>.

Há de se considerar que a hipotrofia é um processo que apresenta características específicas para cada tipo de músculo e o músculo sóleo é o mais comprometido em situações de desuso por ser predominantemente formado por fibras do tipo I, por ser um músculo anti-gravitacionário e por possuir menor adaptação em relação às fibras do tipo II<sup>8</sup>. Nesse sentido tem se observado que as fibras lentas em situação de desuso apresentam marcantes alterações histofisiológicas como irregularidades no retículo sarcoplasmático, fibrilas desintegradas, lesão mitocondrial, linhas Z estendidas, como condensação e fragmentação da cromatina nuclear e redução de sarcômeros em paralelo e em série.

O modelo de órtese escolhido para esse estudo foi a órtese de resina acrílica proposto por Silva *et al.*<sup>12</sup>, sendo um sistema que promove a imobilização da articulação do tornozelo mantendo-o na posição de 90° e apresentando algumas vantagens se comparado aos demais modelos por apresentar baixo peso, possibilidade de ser ajustado para o tamanho da perna do animal impossibilitando a retirada e ainda permitindo a deambulação. Alguns trabalhos previamente realizados com esse modelo de órtese demonstraram redução da área das fibras do músculo sóleo, da força máxima necessária para a ruptura muscular e aumento da densidade de área do tecido conjuntivo do músculo sóleo<sup>13</sup>.

Os diferentes estudos demonstram os efeitos decorrentes da imobilização em animais jovens, existindo poucos trabalhos cujo foco é o efeito da imobilização em ratos envelhecidos, entendendo-se que nessa fase, existem significativas modificações fisiológicas que acompanham o envelhecimento<sup>14</sup>.

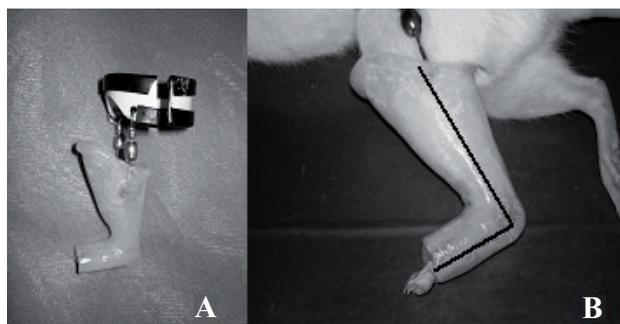
O comprometimento do desempenho neuromuscular, evidenciado pela fraqueza muscular, pela lentificação dos movimentos, pela perda da força e fadiga muscular precoce, constitui aspecto marcante do envelhecimento<sup>15</sup>.

Assim, o objetivo desse estudo foi demonstrar o comportamento metabólico da musculatura de ratos jovens e envelhecidos quando submetidos à imobilização articular de membro posterior na posição de 90°.

## 2 Material e Métodos

Foram utilizados ratos albinos Wistar com idade de três e vinte e quatro meses de idade, adquiridos junto à empresa ANILAB- Paulínia, SP. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, sendo submetidos a ciclo fotoperiódicos de 12 horas claro/escuro e distribuídos em quatro grupos experimentais (n=6), assim denominados: jovens (J), jovens imobilizados (JI), envelhecidos (E) e envelhecidos imobilizados (EI). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da UFSCar, Protocolo 015/2006.

Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg, i.p), a pata posterior esquerda dos animais foi imobilizada utilizando-se o modelo de órtese de resina acrílica proposto por Silva *et al.*<sup>12</sup> (Figura 1). Após sete dias de imobilização, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o músculo sóleo, gastrocnêmio porção branca, gastrocnêmio porção mista, extensor longo dos dedos e tibial anterior, foram retirados e encaminhados para determinação das reservas glicogênicas, do peso e da relação proteína total/DNA. Para a determinação das reservas glicogênicas, as amostras dos músculos foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. O glicogênio foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de Siu *et al.*<sup>16</sup>.



**Figura 1:** (A) Modelo de órtese na imobilização, (B) Adaptação da órtese no membro posterior do animal

Para a determinação do conteúdo de proteínas totais foi utilizado o kit laboratorial da marca Bio Diagnóstica® e para determinação do conteúdo de DNA utilizou-se a metodologia proposta por Giles e Myers<sup>17</sup>. A avaliação estatística foi utilizada pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido de ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## 3 Resultados e Discussão

Inicialmente foi avaliado o conteúdo glicogênico do grupo jovem e observado que a imobilização provocou redução significativa nas reservas atingindo valores 40 % menores no músculo sóleo, 30% no gastrocnêmio porção branca, 59,5% no gastrocnêmio porção mista, 29,4% no músculo extensor longo dos dedos e 50% no músculo tibial anterior, (p<0,05).

No mesmo perfil de análise, foram avaliadas as reservas glicogênicas dos músculos dos ratos envelhecidos e foi verificado que a imobilização promoveu redução em maior intensidade se comparado ao observado no grupo jovem imobilizado durante o mesmo período, atingindo no sóleo valores 64% menores. No gastrocnêmio porção branca a redução foi de 51%, no gastrocnêmio porção mista 47%, no extensor longo dos dedos 48,8% e no tibial anterior 48,6%, (p<0,05) como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1:** Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB), gastrocnêmio porção mista (GM), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) de ratos jovens (J) e envelhecidos (E) dos grupos controle (C) e imobilizados (I)

Grupos	S	GB	GM	ELD	TA
JC	0,30 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,30 ± 0,02
JI	0,18 ± 0,03*	0,28 ± 0,02*	0,15 ± 0,02*	0,24 ± 0,03*	0,15 ± 0,01*
EC	0,55 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,35 ± 0,01
EI	0,20 ± 0,01#	0,23 ± 0,01#	0,27 ± 0,01#	0,21 ± 0,03#	0,18 ± 0,02#

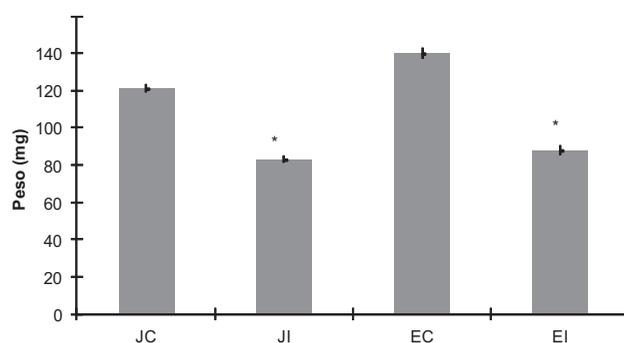
Os valores representam as médias ± epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao jovem controle, #p<0,05 comparado ao envelhecido controle.

A seguir, foi avaliado o peso do músculo sóleo (músculo escolhido devido a melhor delimitação anatômica), sendo observado que houve redução de 31% no grupo jovem imobilizado e 37% no grupo envelhecido imobilizado, indicando que a proteólise induzida pelo desuso foi mais intensa no grupo envelhecido (p<0,05). No mesmo contexto, avaliou-se a relação proteína total/DNA (PT/DNA) sendo verificado que no grupo jovem imobilizado a redução foi de 20% no sóleo, 49,5% no gastrocnêmio porção branca, 32,6% no gastrocnêmio porção mista, 20% no músculo extensor longo dos dedos e 16% no músculo tibial anterior, (p<0,05). Por outro lado, o grupo envelhecido apresentou maior redução na relação PT/DNA atingindo a média de 60% (p<0,05) como pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Relação proteína total/DNA (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB), gastrocnêmio porção mista (GM), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) de ratos jovens (J) e envelhecidos (E), controle (C) e imobilizados (I)

Grupos	S	GB	GM	ELD	TA
JC	40 ± 1,2	56 ± 2,8	43 ± 1,3	60 ± 2,8	50 ± 2,9
JI	32 ± 1,3*	28,3 ± 1,2*	29 ± 2,3*	48 ± 0,7*	42 ± 0,9*
EC	36,7 ± 1,8	40 ± 2,2	36 ± 1,8	47 ± 3,0	41 ± 2,0
EI	20 ± 1,6#	16 ± 1,3#	23 ± 1,0#	21 ± 2,0#	26 ± 3,2#

Os valores representam as médias ± epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao jovem controle, #p<0,05 comparado ao envelhecido controle.



Os valores representam as médias ± epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle

**Figura 2:** Peso do músculo sóleo (mg) nos grupos jovem (J) e envelhecido (E), dos grupos controle (C) e imobilizado (I)

#### 4 Discussão

A atrofia muscular esquelética é constituída por um processo finamente regulado, acompanhado de inúmeras alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que repercutem na funcionalidade dos músculos afetados<sup>18</sup>. Embora seja bem estabelecido que a atrofia muscular seja caracterizada pela diminuição do conteúdo protéico, do diâmetro da fibra, da produção de força muscular e pela fadiga, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na instalação da atrofia muscular por desuso não estão totalmente delimitados<sup>19,20</sup>.

O padrão metabólico das fibras musculares ajusta-se, constantemente, de acordo com a flutuação na disponibilidade de substratos metabolizáveis, sendo influenciado pela sensibilidade e população de receptores de insulina, pela atividade de sistema específico ligado à captação de glicose e pela atividade das enzimas-chave do metabolismo de carboidratos, eventos associados que ressaltam a importância do conteúdo glicogênico<sup>21</sup>. Assim, o presente estudo iniciou-se avaliando o conteúdo glicogênico muscular, uma vez que, esta reserva é marcadora tanto das condições energéticas quanto da performance do músculo esquelético<sup>22</sup>.

Ao se avaliar as reservas de glicogênio observa-se que a imobilização promoveu redução significativa nas reservas, indicando redução na cascata sinalizadora de insulina, caracterizado pelo quadro de resistência à insulina e promovendo consequentemente redução nas reservas glicogênicas<sup>23,24</sup>.

No mesmo perfil de análise foram avaliados os músculos dos ratos envelhecidos e também foi verificado redução nas reservas glicogênicas, porém, em maior intensidade do que aquela observada no grupo jovem imobilizado. As reservas reduzidas são decorrentes de modificações no equilíbrio metabólico que acompanham a fisiologia do envelhecimento sendo representado principalmente pela redução, tanto na captação da hexose, quanto na atividade das enzimas da via glicogênica<sup>14</sup>. Outro fator que colabora para o entendimento

das baixas reservas glicogênicas se refere ao fato do envelhecimento proporcionar redução na população de GLUT 4, como demonstrado neste estudo, reiterando estudos posteriores realizados em ratos com 20 meses de idade, onde sugere-se haver diminuição expressiva na população de GLUT4 concomitante a progressão da idade<sup>25</sup>.

No que tange a imobilização, foi observado que a hipotrofia nos músculos de ratos jovens ocorreu em menor intensidade do que no grupo envelhecido, fato que pode ter relações com maior redução na síntese protéica simultânea à elevação na proteólise<sup>2, 26-28</sup>.

A imobilização pode desencadear uma série de alterações adaptativas nos sistemas orgânicos que se traduzem em perda funcional global e local, comprometendo o tempo de retorno do indivíduo as suas atividades normais. No sistema musculoesquelético, a redução de massa muscular e óssea são os efeitos mais marcantes desse processo<sup>29</sup>. Nas primeiras 6 horas de imobilização já existe redução de 37% nos níveis de síntese protéica<sup>30</sup>.

Ao avaliar o peso do músculo sóleo imobilizado foi observado que o músculo dos ratos envelhecidos sofreu maior perda de massa se comparado ao jovem imobilizado. Nesse contexto, não podemos desconsiderar que haja associação de eventos envolvendo as mudanças no perfil histofisiológico, desencadeados pelo envelhecimento, associado às respostas desencadeadas pelo desuso, sugerindo um somatório de ações que comprometem o músculo envelhecido com maior intensidade.

De forma geral, tem sido relatado que os músculos esqueléticos na fase de envelhecimento apresentam redução na velocidade de encurtamento, redução na quantidade de cálcio liberado do retículo sarcoplasmático frente ao potencial de ação, redução da força (concêntrica, excêntrica ou isométrica) e redução no número de unidades motoras<sup>31-33</sup>.

Mais recentemente, foi demonstrado que músculos envelhecidos apresentam redução na síntese protéica determinado pela diminuição da transcrição do mRNA indicando uma base genética no comprometimento da síntese protéica<sup>34</sup>. A diminuição na síntese protéica evidenciada nos músculos envelhecidos pode também ter relação com as alterações bioenergéticas, baseado no fato de que as etapas bioquímicas do anabolismo requerem a utilização de grandes quantidades de energia e o músculo envelhecido apresenta redução na quantidade de mitocôndrias bem como nas enzimas ligadas ao metabolismo aeróbio<sup>35</sup>.

#### 4 Conclusão

As respostas desencadeadas pela imobilização no músculo esquelético envelhecido ocorreram precocemente e numa intensidade maior se comparado ao grupo jovem, sugerindo cuidados especiais na prática fisioterapêutica prescrita à reabilitação de idosos.

#### Referências

1. Halar EM, Kathleen RB. Imobilidade. In: DeLisa JA. Tratado de medicina e reabilitação: princípios e práticas. São Paulo: Manole; 2002. p.1067-87.
2. Voltarelli FA, Mello MAR, Duarte JAR. Atrofia muscular esquelética e modelos experimentais: apoptose e alterações histológicas, bioquímicas e metabólicas. Rev Educ Fis 2007;18(1):85-95.
3. Talmadge RJ. Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. J Appl Physiol 2002;93(4):1487-97.
4. Reardon KA, Fracp BS, Davis J, Kapsa RMI, Choong P, Fracs MD, et al. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. Muscle Nerve 2001;24:893-99.
5. Berg HE, Larson L, Tesch PA. Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. Am Physiol Soc 1997;182-7.
6. Grana EA, ChiouTan F, Jaweed MM. Endplate dysfunction in health muscle following a period of disuse. Muscle Nerve 1996;19:989-93.
7. Hilder TL, Tou JC, Grindeland RE, Wade CE, Graves LM. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. FEBS Lett 2003;553:63-7.
8. 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.
9. Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. Cell Tissue Res 2000;302(2):235-41.
10. Kasper CE, Talbot LA, Gaines JM. Skeletal muscle damage and recovery. AACN Clin 2002;13(2):237-47.
11. Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. Anat Rec 1997;248(3):355-65.
12. Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Proposal for rat hind limb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. Braz J Med Biol Res 2006;39:979-85.
13. Durigan JLQ, Kalil CND, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análises metabólicas e morfométricas. Rev Fisoter Univ São Paulo 2006;13(2):31-7.
14. Lacourt MX, Marini LL. Decréscimo da função muscular decorrente do envelhecimento e a influência na qualidade de vida do idoso: uma revisão da literatura. Rev Bras Ciên Envel Humano 2006;114-21.
15. Kauffman TL. Manual de reabilitação geriátrica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
16. Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. J Appl Physiol 1970;28(2):234-6.
17. Giles KW, Myers. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature 1965;206(4979):93.
18. Powers Sk, Kavazis AN. Inactivity-induced skeletal muscle atrophy: a brief review. Rev Port Ciênc Desporto 2008;8(2):299-307.
19. Kandarian SC, Stevenson EJ. Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. Exer Sports Sci Rev 2002;30:111-6.

20. Glass DJ. Molecular mechanisms modulation muscle mass. *Trends Mol Med* 2003;9(8):344-50.
21. Taylor R. Insulin action. *Clin Endocrinol* 1991;34:159-71.
22. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20(4):665-79.
23. Nicholson WF, Watson PA. Glucose uptake and glycogen synthesis in muscles from immobilized limbs. *J Appl Physiol* 1984;56:431-5.
24. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279(6):1235-41.
25. Seraphim PM, Nunes MT, Machado UF. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month old rats: insights from different types of data analysis. *Braz J Med Biol Res* 2001;34(10):1353-62.
26. Goldspink DF, Morton AJ, Loughna P, Goldspink G. The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscle. *Pflugers Arch* 1986;407:333-40.
27. Jasper SR, Tischer ME. Role of glucocorticoids in the responses of rat leg muscles to reduced activity. *Muscle Nerve* 1986;9:554-61.
28. Di Prampero PE, Narici MV. Muscles in microgravity: from fibers to human motion. *J Biomech* 2003;36(3):403-12.
29. Clark BC. In vivo alterations Skeletal muscle form and function after disuse atrophy. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41:1869-75.
30. Booth FW, Seider MJ. Recovery of skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. *J Appl Physiol* 1979;47:974-7.
31. Deschenes MR. Effects of aging on muscle fiber type and size. *Sport Med* 2004;34(12):809-24.
32. Lindstrom B, Lexell J, Gerble B. Skeletal muscle fatigue and endurance in young and old man and women. *J Gerontol. Biol Sci Med Sci* 1997;52:59-66.
33. Stalberg R, Fawcett PRW. Macro EMG in healthy subjects of different ages. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1982;45:870-8.
34. Balagopal P, Schimke JC, Ades P. Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am J Physiol* 2001;280:203-8.
35. Boffoli D, Scacco SC, Vergari R. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1994;1226:73-82.

