



Acta Scientiarum. Health Sciences

ISSN: 1679-9291

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá

Brasil

Marques Gomes Bertolini, Sônia Maria; de Oliveira, Priscila Daniele; Cararo, Deisy Carla
Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos da linhagem wistar pós-imobilização articular

Acta Scientiarum. Health Sciences, vol. 32, núm. 1, 2010, pp. 23-27

Universidade Estadual de Maringá

Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307226626004>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos da linhagem wistar pós-imobilização articular

Sônia Maria Marques Gomes Bertolini, Priscila Daniele de Oliveira* e Deisy Carla Cararo

Curso de Fisioterapia, Centro Universitário de Maringá, Av. Guedner, 1610, 87050-390, Jardim Aclimação, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: prisciladanielefisio@hotmail.com

RESUMO. Todos os tipos de imobilização contribuem para a atrofia muscular e, em apenas alguns dias, os músculos passam por diminuição de volume ou perda de função, conhecidos como atrofia. Assim, com uma ou duas semanas de imobilização, as atividades metabólicas são consideravelmente reduzidas e suas fibras musculares substituídas por tecido cicatricial fibroso denso. Dessa forma, este estudo teve como objetivo analisar o efeito da imobilização articular do músculo sóleo do membro posterior de ratos no perfil morfométrico, em diferentes períodos. Foram utilizados dez *Rattus naverigicus albinus* machos, variedade *Wistar*, que foram divididos em dois grupos com cinco animais cada, sendo o primeiro grupo submetido à imobilização por sete dias e o segundo por 14 dias. O controle do experimento foi obtido a partir do membro contralateral direito do respectivo animal. A imobilização do membro posterior esquerdo foi por meio de uma órtese adaptada. A análise morfométrica do sóleo foi realizada por meio de cortes transversais não seriados de 5 µm de espessura. Foram analisadas, por meio das imagens obtidas, a área das fibras musculares, juntamente com a densidade do tecido conjuntivo, comparando-as ao Grupo-controle, referentes à perna contralateral. Com sete e 14 dias de imobilização, pode-se observar redução significativa ($p < 0,05$) na área das fibras musculares, associada a um aumento dos espaços intersticiais, principalmente ao redor dos fascículos musculares. Isto sugere ampliação na densidade do tecido conjuntivo e hipotrofia muscular. Com isso, conclui-se que a imobilização, mesmo que por curto período de tempo, pode alterar a integridade da musculatura esquelética, com importantes implicações funcionais.

Palavras-chave: imobilização, músculo sóleo, atrofia muscular.

ABSTRACT. Morphometric study of post-joint immobilization of soleus muscle on wistar lineage rats. All types of immobilization contribute to muscular atrophy and, in a few days, the muscles undergo volume reduction or loss of function, known as atrophy. Thus, with one or two weeks of immobilization, metabolic activities are considerably reduced and muscle fibers are replaced by dense fibrous scar tissue. This study has as objective to analyze the effect of joint immobilization of the soleus muscle of posterior members of rats on morphometric profile view, at periods of 7 and 14 days. Ten male *Rattus naverigicus albinus*, *Wistar* variety, were used, separated into two groups of 5 animals each, with the first group submitted to immobilization for 7 days and the second for 14 days. The experiment control was acquired from the right contralateral member of each animal. The immobilization of the left posterior member was done by adapted orthosis. The morphometric analysis of soleus was by non-serial cross sections, 5µm thick. From the obtained images, the muscle fibers areas were analyzed, including connective tissue density, comparing with the control group. With 7 and 14 days of immobilization, a significant reduction ($p < 0.05$) in muscle fiber area can be observed, associated with an increase in interstitial spaces, mostly around muscle fascicles. This suggests there is an increase in connective tissue density and muscular hypotrophy. Thus, it can be concluded that immobilization, even for a short period of time, can change skeletal musculature, with important functional implications.

Key words: immobilization, soleus muscle, muscular atrophy.

Introdução

O uso de órteses nos membros constitui, em si mesmo, um ato terapêutico, sujeito a modificações no decurso da reabilitação e na readaptação em

concordância com os cuidados dispensados e processos realizados (PAYSANT et al., 2002). Esses fatores podem afetar negativamente a homeostasia das fibras musculares (KANNUS et al., 1998),

danificando ou não a formação de proteínas miofibrilares, agredindo a sucessão de reações metabólicas e o decurso normal da contração, que, unidos, antecedem a estagnação muscular (CANCELLIERO et al., 2005).

A hipotrofia muscular está relacionada a vários fatores, dentre eles, a deservação, as lesões músculo-esqueléticas, o repouso prolongado, o tratamento com glicocorticoides, a septicemia, o câncer, o envelhecimento e a imobilização articular (BODINE et al., 2001). Com isso, o desuso muscular causa queda nos níveis de repouso do glicogênio e ATP, com sua consequente baixa de concentração e de elevação de lactato durante o exercício (ANDREWS et al., 2000).

A falta de forças fisiológicas que atua sobre o colágeno durante o desuso muscular impede a formação de ligações cruzadas, dando origem a fibras imaturas que são responsáveis pela fibrose (AMIEL et al., 1982). Além disso, algumas fibras necrosam. As do tipo lentas tendem a se transformar em rápidas, com alterações na forma das proteínas miofibrilares e substituição por tecido cicatricial fibroso denso, que sofre contratura fibrosa progressiva com produção de deformidades articulares (SALTER, 2001).

Concomitantemente, há aumento do tecido conjuntivo no perimísio, endomísio e sarcolema, com dispersão dos receptores de acetilcolina e diminuição da relação neuromuscular, juntamente com o potencial da membrana. Dessa forma, ocorre alteração nos terminais neuromotores, evidenciando-se a degeneração e brotação em algumas regiões, levando-se à perda da direção motora, por suas unidades não serem integralmente recrutadas (PLACZECK; BOYCE, 2004).

Amatuzzi e Carazatto (2004) descreve que as técnicas de imobilização utilizadas não só para as lesões estabelecidas, mas também para profilaxia, tais como goteiras ou talas, tração contínua, imobilização rígida e esparadrapagem, desencadeiam a existência de complicações como úlceras de pressão, infecções, dermatites, rigidez articular, isquemia, lesão térmica e, por fim, atrofia. Assim, a estabilização prolongada de uma articulação pode levar à osteoporose por desuso (UHTHOFF; JAWORSKI, 1978), ao decréscimo acentuado de proteoglicanos da cartilagem articular e ao aparecimento de osteoartrite (LANGENSKIÖLD et al., 1979).

Kannus et al. (1998) e Venojärvi et al. (2004) relatam, ainda, as diversas intercorrências, o

aumento da probabilidade de recidivas de lesão, a perda da extensibilidade, o decréscimo da área muscular e da densidade capilar. Carvalho et al. (2002) acrescentam que as características mecânicas do sistema músculo-esquelético submetido à restrição de movimento também ficam comprometidas.

Em decorrência das diversas complicações da imobilização nos músculos, com apenas alguns dias de desuso já pode ocorrer a atrofia, caracterizada pela diminuição de volume ou perda de função (JOÃO, 1999). Este estado inerte ainda contribui para a regressão da quantidade de água, que pode ser responsabilizada pela redução na tensão máxima da fibra muscular (COSTILL; WILMORE, 2001).

Com uma ou duas semanas de imobilização, as atividades das enzimas oxidativas, como succinato desidrogenase (SDH) e a citocromo oxidase, diminuem de 40 a 60%. Isso enfatiza que a capacidade oxidativa dos músculos diminui, danificando-se a resistência muscular e o VOMáx. (COSTILL; WILMORE, 2001).

Segundo Lieber (2002), os músculos denominados antigravitacionais, os uniarticulares e os que possuem maior proporção de fibras lentas (tipo I) são os mais susceptíveis ao desuso muscular. Desse modo, o músculo sóleo tem predomínio de fibras do tipo I, sendo mais vulnerável à atrofia inerente ao desuso.

A literatura relata estudos com diferentes períodos de inatividade muscular, esclarecendo que, após uma semana, há redução do peso em 19% no músculo sóleo (THOMPSON et al., 1998) e, decorridos dois meses, pode um músculo normal perder metade de seu volume (CHONIAK et al., 2004). Alguns autores indicam que grande parte das mudanças ocorre nos primeiros sete dias (OKITA et al., 2004; JÓZSA et al., 1988; WILLIAMS; GOLDSPINK, et al., 1984). Porém, outros trabalhos demonstram atrofia significativa no período de 14 dias em diferentes modelos de desuso muscular, nos quais há redução de 45% do peso muscular nos músculos imobilizados (BODINE et al., 2001; PICQUET; FALEMPIN, 2003).

Considerando-se que a força, a potência, a resistência, a velocidade, a agilidade e a flexibilidade (COSTILL; WILMORE, 2001) são afetadas com a inatividade pela alteração da homeostasia do metabolismo das fibras musculares, há influência direta no diagnóstico, no tratamento e na prevenção de lesões esportivas e ortopédicas (LIMA et al., 2007), e estudos sobre os efeitos dos diferentes períodos de imobilização

possuem grande relevância para a prática clínica. Dessa forma, este estudo teve como objetivo analisar o efeito da imobilização articular do músculo sóleo do membro posterior de ratos no perfil morfométrico, em diferentes períodos.

Material e métodos

Esta pesquisa caracteriza-se como analítica e experimental, tendo sido aprovada pelo Comitê de Bioética Animal do Cesumar (COBAC) de acordo com o Parecer nº 015/2007. Para sua realização, foram utilizados dez *Rattus naverigicus albinus* machos, variedade *Wistar* (três a quatro meses, 250-300 g). Estes foram divididos em dois grupos, com cinco animais cada, sendo o primeiro grupo submetido à imobilização por sete dias e o segundo por 14 dias. O controle do experimento foi obtido a partir do membro contralateral direito do respectivo animal. Os ratos permaneceram no Biotério do Centro Universitário de Maringá - Cesumar, onde ficaram em caixas de polipropileno com 39 cm de comprimento, 32 cm de largura e 16 cm de altura. O ambiente era climatizado e controlado em períodos claro/escuro com 12h de duração cada. A água e a ração estavam disponíveis diuturnamente.

Os animais foram anestesiados com uma associação anestésica de Ketamina (50 mg kg⁻¹) e cloridrato de Xilazina (10 mg kg⁻¹), via intraperitoneal, com o volume de 0,1 mL para cada 100 g de peso, de forma que estivessem completamente sedados para a efetivação da imobilização do membro posterior esquerdo, por meio de uma órtese, a qual possuía uma adaptação para o segmento a ser imobilizado.

Após o período experimental, os animais foram sacrificados, conforme as fases de imobilização, com dosagem letal de Tiopental Sódico 45 mg kg⁻¹ de peso (1 g) diluído em água (22 mL), por via intraperitoneal. Em seguida, ocorreu a separação do músculo sóleo para a verificação histológica.

Para a análise morfométrica, foi retirado da parte média do músculo sóleo um segmento de 1 cm², que foi fixado em solução tamponada de formol a 10% e o material passou por um processo de banho em parafina, obtendo-se vários cortes seriados transversais de 5 µm de espessura (cinco cortes para cada animal com a seleção de 15 campos para a análise), os quais foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e fixados com resina *Permount*. Após a preparação das lâminas (coradas alternadamente em sequência), a observação foi auxiliada pelo

microscópio óptico Olympus BX40 e fotografada em fotomicroscópio BX50, com equipamento fotográfico PM10AK.

A área das fibras musculares, juntamente com a densidade do tecido conjuntivo, relacionando ao Grupo-controle referente à perna contralateral, foram analisadas por meio do software Image Pro Plus 4.5, com objetiva de 10 X. A análise estatística foi obtida por meio do teste 't' de Student, por meio do Software Microsoft Excel.

Tabela 1. Constituição dos grupos de animais em relação ao sacrifício pós-imobilização.

Grupos	Sacrifício dos animais pós-imobilização
C e E	sete dias
C e E	14 dias

Resultados

Por meio da análise histológica e morfométrica, foi possível verificar diferenças consideráveis entre os membros imobilizados e autocontroles dos animais submetidos ao experimento.

Com sete e 14 dias de imobilização, pode-se observar redução significativa ($p = 0,04$ e $0,0002$, respectivamente) na área das fibras musculares associada a um aumento dos espaços intersticiais ($p = 0,02$ e $0,004$, respectivamente), principalmente ao redor dos fascículos musculares (Figuras 1 e 2 e Tabelas 1 e 2, respectivamente), sugerindo-se, assim, ampliação na densidade do tecido conjuntivo e hipotrofia muscular.

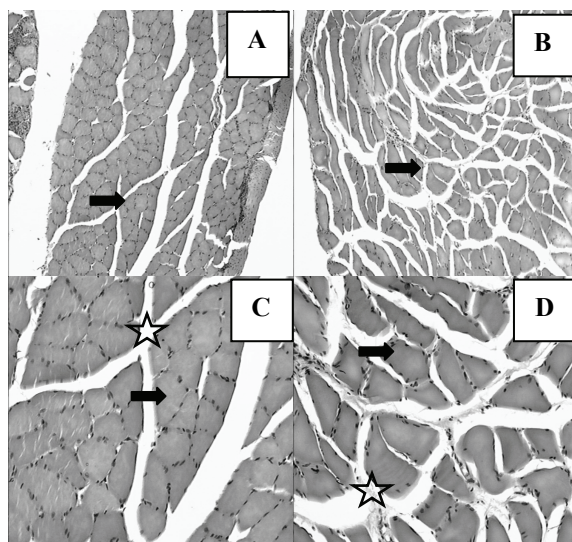


Figura 1. Fotomicrografia de uma secção transversal de 1 cm² do músculo sóleo. A (controle) e B (experimental): sete dias. H. E. 4X. C (controle) e D (experimental): sete dias. Observar fibra muscular (seta) e espaço intersticial (*). H. E. 125X.

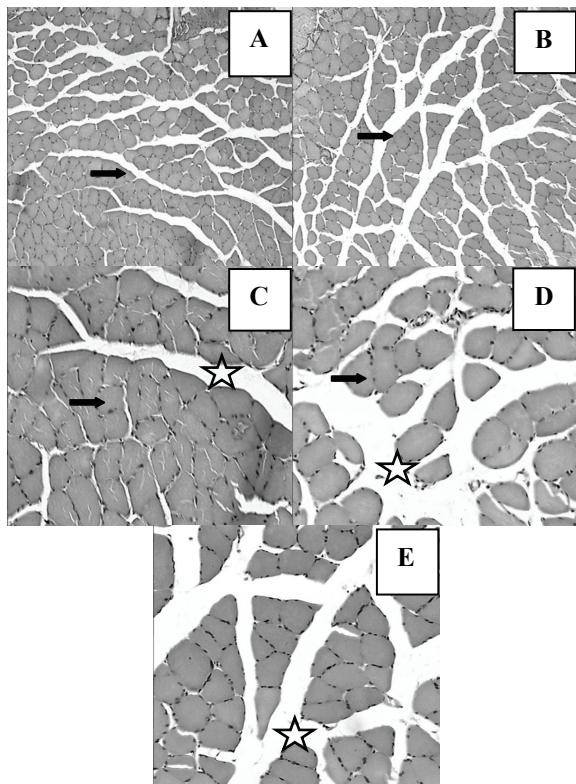


Figura 2. Fotomicrografia de uma secção transversal de 1 cm² do músculo sóleo. A (controle) e B (experimental): 14 dias. H. E. 4X. C (controle), D e E (experimental): 14 dias. Observar fibra muscular (seta) e espaço intersticial (*).H. E. 125X.

Tabela 1. Média, desvio-padrão e Coeficiente de Variação (CV) da área das fibras (μm^2) do músculo sóleo nos grupos controle e experimental.

Medidas	7 dias		14 dias	
	C	E	C	E
Média	3.290,86	2.430,453	2.457,4	1.497,6
Desvio-Padrão	607,4326	1.208,44	727,5934	301,4373
CV (%)	36,7	25,0	29,7	20,1

Tabela 2. Média, Desvio-padrão e Coeficiente de Variação (CV) da distância entre as fibras (μm) do músculo sóleo nos grupos controle e experimental.

Medidas	7 dias		14 dias	
	C	E	C	E
Média	1.701	3.790	1.401	4.497
Desvio- padrão	1.039	1.393	341	1.776,1
CV (%)	61,1	36,8	24,3	39,5

Discussão

Os resultados obtidos demonstraram que, em ambos os grupos de sete e 14 dias, houve perda na área das fibras e aumento de espaço entre os feixes musculares. Tais alterações são relatadas por Kannus et al. (1998) e Venojarvi et al. (2004) como aumento de tecido conjuntivo intramuscular no endomísio e perimísio, o que também foi verificado por Durigan et al. (2006) em seus estudos experimentais em ratos.

Essa redução no diâmetro das fibras pode ser

explicada pelas modificações na síntese e degradação proteica. Alguns estudos evidenciaram, já nas primeiras 24h, redução de 50% no músculo sóleo de ratos e da ativação nervosa (TAILLANDIER et al., 2003; HÄKKINEN, 1985). Em nossa pesquisa, as diferenças mais evidentes entre os membros (controle e experimental) foram notadas na segunda semana de imobilização.

Paralelamente, Bodine et al. (2001) e Picquet e e Falempin (2003) descrevem que a atrofia muscular no período de 14 dias mostra redução de 45% do peso muscular nos músculos imobilizados, indicando possível decréscimo na área da fibra muscular.

Gomes et al. (2004) observaram diminuição de 43% da área da fibra do músculo sóleo imobilizado durante três semanas, bem como na área de secção transversa (16%) em apenas dois dias de imobilização, e a perda foi mais significativa no sexto dia. Entretanto, Appell (1986) relata que a diminuição mais pronunciada do diâmetro das fibras acontece durante a primeira semana de imobilização. No entanto, as correlações entre os membros experimentais e autocontroles mostraram-se mais discretas, apesar de presentes.

Nesse sentido, os achados desta pesquisa indicam que a atrofia muscular é resultado da diminuição da síntese proteica e do aumento na degradação de proteínas, com consequente restrição do seu conteúdo (WINESKI et al., 2002). Estes achados sugerem ainda que o desuso muscular causa progressiva redução da força, associado ao decréscimo na área de secção transversa das fibras musculares (THOMPSON, 1994).

Conclusão

A imobilização, mesmo por curto período de tempo, pode alterar a integridade da musculatura esquelética com importantes implicações funcionais.

Referências

- AMATUZZI, M. M.; CARAZATTO, J. G. **Medicina do esporte**. São Paulo: Roca, 2004.
- AMIEL, D.; WOO, S. L. Y.; FREDERICK, L.; HARWOOD, W. H. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 53, n. 3, p. 325-332, 1982.
- ANDREWS, J. R.; HARRELSON, G. L.; WILK, K. E. **Reabilitação física das lesões desportivas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- APPELL, H. J. Morphology of immobilized skeletal muscle and the affects of a pre and post-immobilization training program. **International Journal of Sports Medicine**, v. 7, n. 1, p. 6-12, 1986.

- BODINE, S. C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V. K. M.; NUNEZ, L. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.
- CANCELLIERO, K. M.; DIAS, C. N. K.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R.; CHINGUI, J. L. Imobilização em flexão plantar do tornozelo induz alteração metabólica em músculo esquelético de ratos. **Fisioterapia Brasil**, v. 4, n. 6, p. 277-280, 2005.
- CARVALHO, C. M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. B. Efeitos da imobilização e do exercício físico em propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, v. 18, n. 2, p. 65-73, 2002.
- CHONIAK, R.; VIDEIRA, R. V. S.; RUIZ, S. A. L.; LIMA, S. M. M.; MONTAGNINI, A. L. Atrofia muscular em pacientes oncológicos internados em unidade de terapia intensiva. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 2, p. 77-82, 2004.
- COSTILL, D. L.; WILMORE, J. H. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.
- DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; DIAS, C. N. K.; SILVA, C. A. Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análise metabólica e morfométrica. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 13 n. 2, p. 31-36, 2006.
- GOMES, A. R. S.; COUTINHO, E. L. C. N.; FRANÇA, J. P.; SALVINI, T. F. Effect of fone stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1473-80, 2004.
- HÄKKINEN, K. Factors influencing trainability of muscular strength during short term and prolonged training. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 7, n. 2, p. 32-37, 1985.
- JOÃO, S. M. Imobilização e fisioterapia. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, v. 6, supl. esp., p. 28, 1999.
- JÓZSA, L.; THORING, J.; JÄRVINEN, M.; KANNUS, P.; LEHTO, M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 48, n. 2, p. 267-278, 1988.
- KANNUS, P.; JÓZSA, L.; JÄRVINEN, T. L. N.; KVIST, M.; VIENO, T. Free immobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 4, p. 1418-1421, 1998.
- LANGENSKIÖLD, A.; MICHELSSON, J. E.; VIDEMAN, T. Osteoarthritis of knee in the rabbit produced by immobilization. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 1-14, 1979.
- LIEBER, R. L. **Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott, 2002. p. 288-285.
- LIMA, S. C.; CAIERÃO, Q. M.; DURINGAN, J. L. Q.; SCHWARZENBECK, A.; GUIRRO, R. R. J. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 4, p. 297-302, 2007.
- OKITA, M.; YOSHIMURA, T.; NAKAMO, J.; MOTOMURA, M.; EGUCHI, K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat muscle. **Journal of Anatomy**, v. 25, n. 4, p. 159-166, 2004.
- PAYSANT, J.; MARTINET, M.; FERRY, M. F.; ANDRÉ, J. M. Uso provisional de ortesis en los miembros. In: **ENCYCLOPÉDIE médico-chirurgicale kinesiterapia medicina fisica**. Paris: Elsevier, 2002. p. 26-160.
- PICQUET, F.; FALEMPIN, M. Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. **Experimental Neurology**, v. 184, n. 1, p. 186-194, 2003.
- PLACZECK, J. D.; BOYCE, D. A. **Segredos em fisioterapia ortopédica**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- SALTER, R. B. **Distúrbios e lesões do sistema músculos esquelético**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- TAILLANDIER, D.; AUROUSSEAU, E.; COMBARET, L.; GUEZENNEC, C. Y.; ATTAIX, D. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, n. 5, p. 665-675, 2003.
- THOMPSON, C. Experimental muscular atrophy. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 16, n. 3, p. 564-571, 1994.
- THOMPSON, L. V.; JOHNSON, S. A.; SHOEMAN, J. A. Single soleus muscle fiber function after hindlimb unweighting in adult and aged rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 6, p. 1937-1942, 1998.
- UHTHOFF, H. K.; JAWORSKI, Z. F. G. Bone loss in response to long-term immobilisation. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60, n. 3, p. 420-429, 1978.
- VENOJARVI, M.; KVIST, M.; ATALAY, M.; LOZSA, L.; KALIMO, H. Recovery from immobilisation: responses of fast-twitch muscle in rat calf muscles. **Pathophys**, v. 11, p. 17-22, 2004.
- WILLIAMS, P. E.; GOLDSPIK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **Journal of Anatomy**, v. 138, n. 2, p. 343-350, 1984.
- WINESKI, L. E.; DEUTSCH, D. A.; IMAD, K. A.; SIDNEY, A.; POTTER, D. E.; PAULSEN, D. F. Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature, male rats. **Cells Tissues Organs**, v. 171, n. 2-3, p. 188-198, 2002.

Received on December 1, 2008.

Accepted on March 12, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

