



exercício em músculo sóleo de ratos imobilizados em encurtamento

Remobilization by cycle static stretching in soleus muscle of rats immobilized in shortening position

Evandro Augusto Boian Konno¹
Éder Paulo Belato Alves²
Gladson Ricardo Flor Bertolini²
Cláudio Henrique Barbieri³
Nilton Mazzer⁴

1. Especialista em Fisioterapia Ortopédica e Traumatológica pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Campus de Cascavel - PR;
2. Docente da Unioeste, Campus de Cascavel - PR;
3. Professor Titular da FMRP-USP, Ribeirão Preto - SP;
4. Professor Livre-docente da FMRP-USP, Ribeirão Preto - SP.

Endereço para correspondência:

Gladson Ricardo Flor Bertolini,
Clínica de Fisioterapia da Unioeste,
Rua Universitária, 2069. Jardim
Universitário, Cascavel - PR, Caixa
Postal 711, CEP 85819-110.
Email: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Submetido em 10/05/2007
Versão final recebida em 01/11/2007
Aceito em 09/12/2007

RESUMO

A fibra muscular tem grandes propriedades plásticas, respondendo a diferentes estímulos com o aumento ou diminuição de sua massa, comprimento e número de sarcômeros em série. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do alongamento passivo estático em 3 séries diárias de 30 s e da remobilização livre, por um período de duas semanas, no músculo sóleo de ratos imobilizado em posição de encurtamento. Para isso, foram utilizados 12 ratos (Wistar) divididos em 2 grupos: G1 (n=6) – músculo sóleo esquerdo (MSE) imobilizado e solto na gaiola (GIS); G2 (n=6) – MSE imobilizado e alongado diariamente (GIA). Foram comparadas as variações encontradas entre o MSE e o MSD (direito) de cada grupo. As variáveis foram: peso muscular, comprimento muscular, número de sarcômeros em série e comprimento de sarcômeros. Os resultados das variáveis analisadas, comparando o MSE com o MSD foram: peso muscular: GIS=-23,16%, (p=0,0007), GIA=32,43% (p=0,0008); comprimento muscular: GIS=-5,47% (p=0,0120); GIA=-9,99% (p=0,0034); número de sarcômeros em série: GIS=-15,42% (p=0,0047); GIA=-8,08% (p=0,0008); comprimento do sarcômero: GIS=11,16% (p=0,0142); GIA=-1,92% (p=0,3783). Através desses resultados, pode-se concluir que nem o alongamento, nem a remobilização livre promovem a restauração na estrutura dos músculos esqueléticos submetidos à imobilização prolongada.

Palavras-chave: imobilização, remobilização, alongamento muscular.

ABSTRACT

Muscle fibers have great plastic properties, responding to different stimuli with their weight increase or reduction, length and serial sarcomere number. The aim of this study was to analyze the static passive stretching in 3 daily bouts of 30 s and the free remobilization effects for two weeks, in the soleus muscle of rats immobilized in shortening position. For this purpose, 12 rats (Wistar) were used and divided in 2 groups: G1 (n=6) – left soleus muscle (LSM) immobilized and free in the cage (GIF); G2 (n=6) - LSM immobilized and stretched daily (GIS). The variations found between the LSM and RSM (right) of each group have been compared. The variables were: soleus muscle weight, length, serial sarcomeres number and sarcomere length. The results comparing LSM with RSM were: muscle weight: GIF=-23.16%, (p=0.0007), GIS=32.43% (p=0.0008); muscle length: GIF=-5.47% (p=0.0120); GIS=-9.99% (p=0.0034); serial sarcomere number: GIF=-15.42% (p=0.0047); GIS=-8.08% (p=0.0008); sarcomere length: GIF=11.16% (p=0.0142); GIS=-1.92% (p=0.3783). It can be concluded through these results that neither the stretching nor the free remobilization promotes restoration in the skeletal muscles structure submitted to prolonged immobilization.

Keywords: immobilization, remobilization, muscle stretching.

INTRODUÇÃO

As fibras do músculo esquelético apresentam plasticidade, ou seja, capacidade de adaptação a determinados estímulos, como exercício físico, imobilização, alterações das condições hormonais, nutrição, inervação, eletroestimulação, entre outros⁽¹⁻⁴⁾.

As fraturas ósseas, rupturas ligamentares, lesões musculares, como também doenças degenerativas ou articulares, podem exigir cirurgia ou tratamento conservador com subsequente imobilização dos membros. Os efeitos da imobilização sobre os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos do músculo esquelético têm sido amplamente estudados, bem como os efeitos da remobilização e do exercício físico sobre os mesmos aspectos^(5,6).

Goldspink⁽⁷⁾ e Shah et al.⁽⁸⁾ afirmam que o alongamento é um poderoso estimulante para a síntese protéica e hipertrofia muscular. Durante o crescimento pós-natal, as fibras do músculo esquelético alongam-se por adição de novos sarcômeros em série, e inclusive músculos adultos são capazes de adaptação a um novo comprimento por adição ou remoção de sarcômeros em série. Para que isso ocorra, o comprimento do sarcômero é ajustado para manter uma relação de comprimento-tensão ideal, e assim promover uma contração muscular eficaz. O efeito do alongamento e a adaptação a um aumento do comprimento funcional estão associados com o aumento da síntese protéica.

Trabalhos realizados na década de 60 e 70 identificaram que o músculo aumentava seu comprimento por meio da adição de sarcômeros ao longo das fibras musculares^(9,10). Posteriormente, Tabary et al.⁽¹¹⁾

mostraram que a imobilização em posição alongada acarreta aumento no comprimento muscular pela adição de novos sarcômeros em série, particularmente nas duas regiões terminais das fibras musculares, e que a imobilização em posição encurtada leva à diminuição do número dos mesmos. Esse fato foi confirmado por pesquisas posteriores^(12,13).

A imobilização, especialmente quando o músculo é mantido em posição encurtada, resulta em redução da síntese de proteínas, relativa à degradação, e em significativa redução na área de secção transversa e na massa, associada com uma perda do número de sarcômeros em série^(14,15).

O alongamento, realizado na prática fisioterapêutica, tem o intuito de manter uma relação ótima de comprimento-tensão dos músculos, e desta forma, atuar no aumento das amplitudes de movimento (ADMs) perdidas, ou evitar a sua diminuição, que muitas vezes é conseqüência da imobilização⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Dessa forma o presente trabalho justifica-se na tentativa de esclarecer alguns fenômenos morfológicos que ocorrem durante o uso de técnicas de alongamentos, como método de remobilização em músculos previamente encurtados pela imobilização.

O objetivo deste estudo consiste em analisar os efeitos do alongamento passivo estático em 3 séries diárias de 30 s e da remobilização livre, por um período de duas semanas, no músculo sóleo de ratos imobilizado em posição de encurtamento, por igual período. Para isso foram analisados, peso muscular, comprimento muscular, número total de sarcômeros em série e comprimento de sarcômero nas fibras musculares.

MÉTODOS

Foram utilizados 12 ratos machos albinos da raça Wistar, com 12 ± 2 semanas de idade e $292,67 \pm 19,90$ g de massa corporal, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

O estudo foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal⁽¹⁹⁾. Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro), com acesso à água e ração *ad libitum*, e foram divididos aleatoriamente em 2 grupos:

- Grupo Imobilizado e Solto (GIS, n=6): os animais deste grupo tiveram a pata posterior esquerda imobilizada em flexão plantar máxima, por 15 dias consecutivos, com intuito de manter o músculo sóleo em posição de encurtamento. Após o período de imobilização, os animais foram soltos na gaiola por mais duas semanas, e não foram submetidos a nenhuma intervenção;
- Grupo Imobilizado e Alongado (GIA, n=6): este grupo foi submetido à imobilização, de forma semelhante a GIS, por um período de 15 dias consecutivos. Após este período, os animais foram submetidos, por mais duas semanas, a alongamentos passivos diários (a cada 24 horas) em seus músculos sóleos esquerdos, com descanso de dois dias ao final de semana. O alongamento foi realizado em três séries de 30 s, com intervalo de 30 s entre as séries.

Para realizar o estudo, utilizou-se como aparato de imobilização um modelo desenvolvido por Coutinho et al.⁽⁵⁾, o qual visa obter o encurtamento do músculo sóleo esquerdo, para isto, a articulação tíbio-társica foi imobilizada em máxima flexão plantar com algodão e fita adesiva e posteriormente colocou-se o modelo de imobilização. Os animais eram diariamente observados, durante os 15 dias em que durava o período de imobilização, devido à possibilidade de danos ao aparato.

Posteriormente à retirada do modelo de imobilização, iniciou-se a remobilização através do uso de alongamento estático. Para efetuar a técnica de alongamento no músculo sóleo, os animais eram previamente anestesiados com éter etílico e a articulação tíbio-társica man-

tida manualmente em flexão dorsal máxima, durante todo o período de alongamento, que consistiu de 3 séries de 30 s, com intervalo de repouso de 30 s entre as séries.

Ao final do experimento, todos os animais foram pesados, sacrificados, e tiveram os músculos sóleos direito (MSD) e esquerdo (MSE) dissecados. Após a retirada dos músculos, estes foram limpos, pesados em balança analítica e fixados em placas de isopor em seu comprimento de repouso, para serem medidos através de paquímetro (Tecnolub), e então colocados em formol (10%) durante 3 h. Após esse período, foram imersos em ácido nítrico (30%), no qual permaneceram por 48 h, visando quebra do tecido conjuntivo e, em seguida, foram armazenados em solução de glicerol (50%).

Após esse procedimento, o músculo foi colocado em uma placa de petri, e com o auxílio de lupa (Micronal), foram isoladas 8 fibras, de tendão a tendão, através de pinças com pontas ultrafinas, e montadas em lâmina histológica, porém apenas 5 fibras foram utilizadas para a contagem do número de sarcômeros, no decorrer de 50 μ m em 6 campos não consecutivos, totalizando 300 μ m. Para realizar a análise utilizou-se um microscópio de luz polarizada (*Olympus*), com objetiva de 60 vezes em imersão, acoplado a um aparelho de televisão de 29 polegadas, o qual teve seu tubo de imagem previamente aferido para a distância correspondente a 50 μ m. A contagem do número de sarcômeros foi realizada sempre pelo mesmo examinador, visando evitar tendências. O cálculo utilizado para estimar o total de sarcômeros em série no músculo foi a regra de três simples.

As variáveis estudadas foram: peso e comprimento do músculo sóleo, comprimento e número de sarcômeros em série. Esses dados foram avaliados comparando os resultados obtidos na pata esquerda (submetidas ao experimento) e direita (intacta), entre os animais do mesmo grupo experimental, utilizando a estatística descritiva (porcentagem, média e desvio-padrão) e o teste *t* de *Student* pareado, sendo considerado significativo $p < 0,05$, com uso do programa *Prism 3.0*.

RESULTADOS

Os resultados deste estudo foram comparados intra-grupos, entre o MSD e o MSE, e estão apresentados a seguir dentro das variáveis analisadas: peso muscular, comprimento muscular, estimativa do número total e comprimento de sarcômeros em série (ENSS).

Peso muscular

Para o GIS o peso de MSD foi $0,1611 \pm 0,0089$ g e de MSE $0,1251 \pm 0,0101$ g, havendo uma diferença significativa de -23,16% ($p=0,0007$). E no GIA as variações foram MSD $0,1500 \pm 0,0147$ g e MSE $0,1012 \pm 0,0151$ g, com diferença significativa de -32,43% ($p=0,0008$) (figura 1).

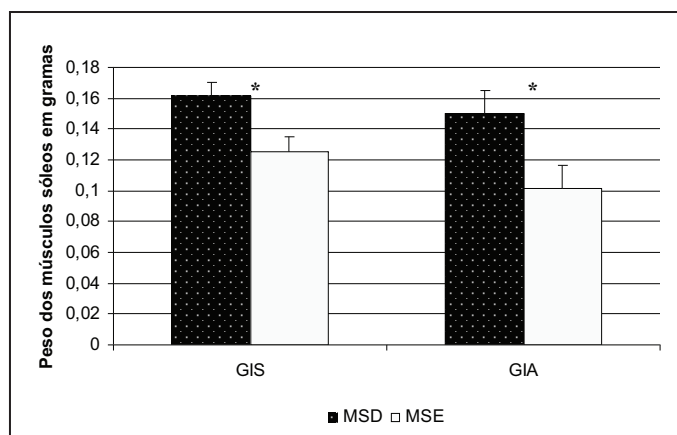


Figura 1. Representação gráfica das variações do peso muscular dos sóleos direito (MSD) e esquerdo (MSE) em gramas.

* diferença estatisticamente significativa.

Comprimento muscular

O GIS apresentou comprimento de MSD de $2,01 \pm 0,09$ cm e de MSE $1,90 \pm 0,11$ cm, havendo uma diferença significativa de $-5,47\%$ ($p=0,0120$). E no GIA as variações foram MSD $2,44 \pm 0,17$ cm e MSE $2,20 \pm 0,10$ cm, com diferença significativa de $-9,99\%$ ($p=0,0034$) (figura 2).

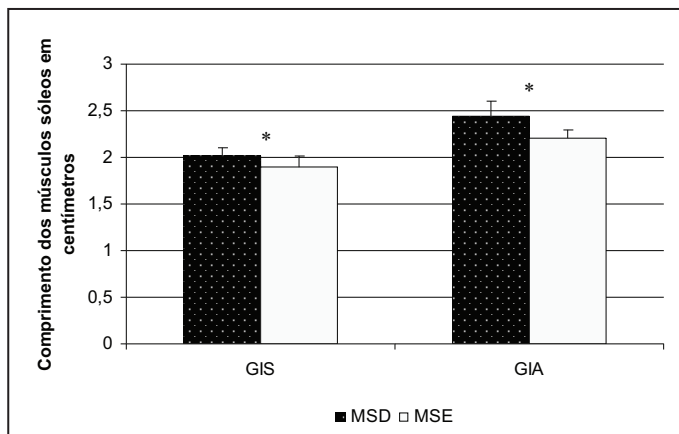


Figura 2. Representação gráfica do comprimento dos músculos sóleos em centímetros.

* diferença estatisticamente significativa.

Estimativa do Total de Sarcômeros em Série

Para o GIS a ENSS do MSD foi $11050,00 \pm 769,70$ e do MSE $9346,00 \pm 499,00$ havendo uma diferença significativa de $-15,42\%$ ($p=0,0047$). E no GIA as variações foram MSD $10890,00 \pm 647,40$ sarcômeros em série e MSE $10010,00 \pm 583,70$, com diferença significativa de $-8,08\%$ ($p=0,0008$) (figura 3).

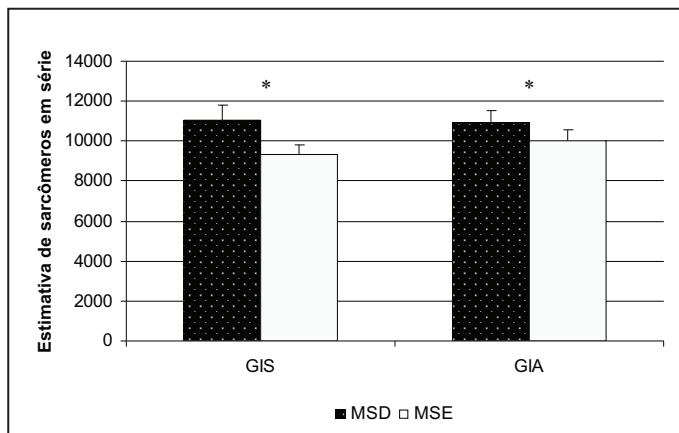


Figura 3. Representação gráfica da estimativa de sarcômeros em série para os músculos sóleos.

* diferença estatisticamente significativa.

Comprimento Médio do Sarcômero

Para o GIS foi observado que o tamanho médio dos sarcômeros foi $1,82 \pm 0,10 \mu\text{m}$ para MSD e $2,03 \pm 0,07 \mu\text{m}$ para MSE, com variação de $11,16\%$, significativa ($p=0,0142$). Para GIA os valores encontrados foram para MSD $2,24 \pm 0,04 \mu\text{m}$ e para MSE $2,20 \pm 0,09 \mu\text{m}$, com variação não significativa ($p=0,3783$) de $-1,92\%$ (figura 4).

DISCUSSÃO

O músculo esquelético exibe uma extraordinária habilidade para remodelar tanto as propriedades estruturais como as metabólicas, em resposta às alterações do meio ambiente⁽⁸⁾ e às perturbações mecânicas em sua estrutura, sofrendo adaptações⁽⁷⁾. Por isso é considerado o

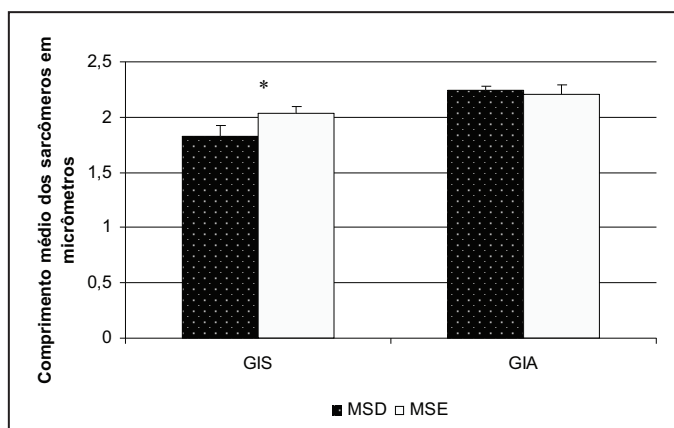


Figura 4. Representação gráfica da variação do comprimento médio dos sarcômeros dos músculos sóleos.

* diferença estatisticamente significativa.

mais mutável dentre os tecidos biológicos, respondendo às demandas normais ou alteradas com adaptações morfológicas e funcionais^(4,6).

Os resultados de vários experimentos têm demonstrado que o comprimento da fibra, ou o número de sarcômeros em série é altamente plástico. Esse fenômeno é observado mais claramente usando modelos de imobilização, nos quais um músculo é mantido em alongamento ou encurtamento crônico^(1,20), ocorrendo mudanças do número de sarcômeros em série em resposta às perturbações crônicas de seu comprimento⁽⁸⁾.

A imobilização, especialmente quando o músculo é mantido em posição encurtada, resulta em redução da síntese de proteína relativa à degradação e em significativa redução na área de secção transversa e na massa, associada com uma adaptação do número de sarcômeros em série^(14,15). A perda da massa muscular observada após a imobilização pode estar correlacionada com uma perda de proteínas miofibrilares^(15,21).

No presente estudo os grupos foram submetidos à imobilização, apresentando dados semelhantes aos encontrados na literatura. A imobilização em encurtamento por 2 semanas resultou em perda significativa do número total de sarcômeros em série, da massa e do comprimento do músculo sóleo, quando comparado ao músculo contra-lateral não submetido à imobilização, comprovando a ação devastadora que a imobilização proporciona ao músculo esquelético.

Diversos estudos têm demonstrado a importância do alongamento para prevenir a proliferação do tecido conjuntivo, atrofia muscular e perda de sarcômeros em série em músculos imobilizados^(7,22). Williams⁽²³⁾ demonstrou que a aplicação de 15 minutos de alongamento a cada 2 dias não foi eficaz para prevenir a perda de sarcômeros em série em músculos previamente encurtados. Entretanto, dois anos após este estudo, Williams⁽²⁴⁾, em outro experimento, relatou que sessões diárias de alongamento aplicadas por 30 minutos em músculo sóleo de ratos, imobilizados sob as mesmas circunstâncias, foram suficientes para prevenir a perda de sarcômeros em série.

Gomes et al.⁽²⁵⁾ estudaram o alongamento passivo aplicado uma vez por semana, com duração de 40 minutos, em um período de 3 semanas no sóleo de ratos imobilizado em posição encurtada, e observaram que não foi o bastante para prevenir a perda de sarcômeros em série, mas promoveu proteção significativa contra a atrofia da fibra muscular. Relatam ainda, que para o grupo imobilizado, foi observado um aumento significativo no comprimento dos sarcômeros, o que também foi encontrado no presente estudo, podendo sugerir um ajuste no comprimento para melhor produção de força muscular.

Contudo, segundo os dados de Gomes et al.⁽²⁵⁾ mesmo para o grupo imobilizado e alongado, havia também aumento no comprimento do sarcômero, o que não foi observado no presente estudo, o que pode ser inferido como reflexo da atividade de remobilização através de alongamento muscular, adaptando mais rapidamente a um comprimento funcional, apesar do número de sarcômeros em série não ter alcançado recuperação total.

Os resultados obtidos no presente estudo, para o grupo imobilizado e posteriormente alongado, apresentaram diferenças significativas em três das variáveis analisadas (peso muscular, comprimento muscular e número total de sarcômeros em série) comparando o MSE com o MSD. Isso sugere que mesmo com um protocolo de alongamento diário realizado durante 2 semanas, os efeitos deletérios da imobilização ainda persistem na fibra muscular, sendo necessário talvez, um maior tempo de remobilização por alongamento. Porém, aponta-se algum efeito benéfico, visto que houve manutenção do comprimento do sarcômero.

Em estudo feito com músculos sóleo de gatos, imobilizados em encurtamento, Tabary et al.⁽¹¹⁾ observaram uma redução de 40% no número de sarcômeros em série e conseqüente diminuição de sua extensibilidade. Quatro semanas após a remoção da imobilização, o músculo em posição de encurtamento apresentou extensibilidade e número de sarcômeros similares ao grupo controle não-imobilizado.

Isso significa que um músculo retraído pode readquirir seu comprimento normal de acordo com a demanda funcional. Nesse caso, a própria marcha produziu o estímulo necessário para o alongamento muscular.

Com o GIS, no presente estudo, todas as variáveis estudadas mostraram-se estatisticamente diferentes, demonstrando que a movimentação livre por 2 semanas não conseguiu devolver ao músculo suas características prévias à imobilização.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que os efeitos deletérios resultantes da imobilização, de 2 semanas, sobrepõem-se aos efeitos da remobilização em 2 semanas, tanto por alongamento quanto pela movimentação livre, observando-se a persistência dos efeitos atroficos e sarcopênicos nesses músculos. Portanto, não se pode afirmar nesse estudo, que o alongamento diário de três séries de 30 s, nem a remobilização livre promovem a restauração na estrutura dos músculos esqueléticos submetidos à imobilização prolongada.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burkholder TJ, Lieber RL. Sarcomere number adaptation after retinaculum transection in adult mice. *J Exp Biol* 1998; 201: 309-16.
- Aoki MS, Miyabara EH, Soares AG, Salvini TF, Moriscot AS. Cyclosporin-A does not affect skeletal muscle mass during disuse and recovery. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 243-51.
- Decoster LC, Scanlon RL, Horn KD, Cleland J. Standing and supine hamstring stretching are equally effective. *J Athl Train* 2004; 39: 330-4.
- Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Horinouchi K, Tanaka N. Induction of myogenin messenger ribonucleic acid in rat skeletal muscle after 1 hour of passive repetitive stretching. *Arch Phys Med Rehabil* 2004; 85: 166-7.
- 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.
- Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Booth FW. Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J Appl Physiol* 2003; 95: 2171-9.
- Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 1999; 194: 323-34.
- Shah SB, Peters D, Jordan KA, Milner DJ, Fridén J, Capetanaki Y, Lieber RL. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol* 2001; 204: 1703-10.
- Goldspink G. Sarcomere length during post natal growth of mammalian muscle fibres. *J Cell Sci* 1968; 3: 539-48.
- Williams PE, Goldspink G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. *J Cell Sci* 1971; 9: 751-67.
- 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.
- Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *J Anat* 1978; 127: 459-68.
- Yang S, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. *J Anat* 1997; 190: 613-22.
- Thomason DB, Biggs RB, Booth FW. Protein metabolism and B-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am J Physiol* 1989; 257: 300-5.
- Thomason DB, Booth FW. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 1990; 68: 1-12.
- Brasileiro JS, Faria AF, Queiroz LL. Influência do resfriamento e do aquecimento local na flexibilidade dos músculos isquiotibiais. *Rev Bras Fisioter* 2007; 11: 57-61.
- Branco VR, Negrão Filho RF, Padovani CR, Azevedo FM, Alves N, Carvalho AC. Relação entre a tensão aplicada e a sensação de desconforto nos músculos isquiotibiais durante o alongamento. *Rev Bras Fisioter* 2006; 10: 465-72.
- Viveiros L, Polito MD, Simão R, Farinatti P. Respostas agudas imediatas e tardias da flexibilidade na extensão do ombro em relação ao número de séries e duração do alongamento. *Rev Bras Med Esporte* 2004; 10: 459-63.
- 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.
- Morgan DL, Proske U. Popping sarcomere hypothesis explains stretch-induced muscle damage. *Clin Exp Pharm Physiol* 2004; 31: 541-5.
- Goldspink DF. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol* 1977; 264: 267-82.
- Goldspink G, Williams P, Simpson H. Gene expression in response to muscle stretch. *Clin Orthop Rel Res* 2002; 403: 146-52.
- Williams PE. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. *Annals Rheum Diseases* 1988; 47: 1014-6.
- Williams PE. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilized muscle. *Annals Rheum Diseases* 1990; 49: 316-7.
- 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.