

# Análise da geração de EROs em músculos esqueléticos imobilizados de ratos

## Autores

---

Luciano Julio Chingui  
Maria Theresa Munhoz Severi  
Rommel Padovan Branquinho  
Karina Maria Cancellero  
Carlos Alberto da Silva

## Orientador

---

Carlos Alberto da Silva

## 1. Introdução

---

A fisiologia neuromuscular mostra que as fibras musculares podem ser de dois tipos: de contração lenta e de contração rápida. Convencionou-se chamá-las respectivamente de tipo I e tipo II. As do tipo II, contração rápida, podem ser desmembradas em IIa, IIb e IIc, de acordo com as funções motoras anaeróbias. As fibras tipo I são responsáveis pelo desempenho dos atletas fundistas (maratonistas, ciclistas de estrada, nadadores de longa distância e etc.), possuem muitas mitocôndrias e enzimas aceleradoras do metabolismo, são volumosas e têm altos níveis de mioglobina, (GUYTON; HALL, 2000). Essas características dão a elas alto poder de carreamento de oxigênio. Mesmo em atividades anaeróbias essas fibras são recrutadas, pois em qualquer situação as três fontes de energia (aeróbia, anaeróbia láctica e aláctica) estão envolvidas, havendo sim, uma predominância para uma ou para outra conforme o movimento (BERNE; LEVY, 2000).

As fibras tipo IIa possuem capacidade tanto aeróbia como anaeróbia sendo assim consideradas intermediárias. O que determina a capacidade oxidativa é a presença das enzimas SDH (Succinato Desidrogenase) e PFK (Fosfofrutocinase), respectivamente aeróbias e anaeróbias que influencia diretamente na velocidade de encurtamento da fibra, essas fibras possuem as duas enzimas. As fibras do tipo IIb possuem maior potencial anaeróbio sendo a verdadeira fibra rápida. As do tipo IIc são mais raras e podem participar da reinervação ou da transformação das unidades motoras (HERBERT; BALNAVE, 1993).

A glicose constitui o substrato energético preferencialmente utilizado pelo músculo, sua captação é realizada de múltiplas maneiras, dependendo da presença da insulina, da atividade metabólica tecidual ou da atividade contrátil das fibras (BELL et al., 1990; KLIP; MARETTE, 1992; GOODYEAR et al., 1991).

A contração muscular é desencadeada por eventos deflagrados após a propagação do potencial elétrico gerado na interface da junção neuromuscular. Esse sinal elétrico ativa sistemas responsáveis pelas variações nas concentrações iônicas citosólicas e pela modulação na atividade metabólica (RICHARSON et al., 1991).

Diversas situações podem comprometer a homeostasia metabólica das fibras musculares: a imobilização (KANNUS et al., 1998a), condição frequente na prática clínica da fisioterapia, período prolongado no leito,

situações de microgravidade (JAGOE; GOLDBERG 2001; JACKMAN, 2004), tratamento de fraturas, de rupturas ligamentares, lesão medular, e razões cirúrgicas (REARDON, et al., 2001).

A imobilização compromete a homeostasia muscular, desencadeando fibrose intramuscular, redução da extensibilidade, limitação de movimento articular e principalmente a hipotrofia muscular (WILLIAMS, 1988; KANNUS et al., 1998a).

Entende-se a hipotrofia muscular como resposta tecidual frente a redução da tensão ou da atividade mecânica muscular, onde o músculo tenta ajustar sua funcionalidade às novas exigências funcionais, (EDGERTON et al. 2002).

Segundo Cros, et al.(1999) a hipotrofia é um processo extremamente ordenado e finamente controlado. São inerentes à hipotrofia, alterações estruturais, metabólicas e bioquímicas (APPELL, 1990).

Edgerton et al. (2002), observaram que a hipotrofia se implanta com certo grau de rapidez, nesse estudo, em 4 e 7 dias de desuso, o músculo sóleo apresentou uma hipotrofia equivalente a 25% e 36% respectivamente. Caracteristicamente, as principais e maiores alterações metabólicas, histológicas e bioquímicas ocorrem nos primeiros dias de imobilização, (APPEL, 1990).

Há consenso entre os pesquisadores de que a perda muscular com ausência de descarga de peso e outros modelos de desuso é um produto de atrofia das fibras musculares esqueléticas e aumento da degradação protéica (BOOTH; CRISWELL, 1997). Porém, os mecanismos desencadeadores celulares e moleculares que levam a essa perda ainda não são bem entendidos (JOHN; WOOK; SCOTT, 2003).

Estudos recentes revelam que o estresse oxidativo pode ter um papel importante na hipotrofia induzida pelo desuso muscular (IKEMOTO et. al., 2002)

O conhecimento sobre os radicais livres de oxigênio (RLO) tem despertado grande interesse nas últimas décadas, pelo papel desempenhado por essas moléculas em várias situações clínicas.

As lesões teciduais pelos RLO estão presentes em condições, como choque hemodinâmico, septicemia, resposta inflamatória sistêmica, hepatites fulminantes, hepatite alcoólica, transplante de órgãos, insuficiência cardíaca e respiratória, entre outras.

Os RLO são átomos ou moléculas que apresentam um elétron não pareado na camada última de valência, são capazes de reagir com outras moléculas contra as quais colidem, retirando elétrons destas substâncias e modificando suas estruturas moleculares (YU, 1994). As colisões com outras moléculas formam outros radicais livres chamados EROs, espécies reativas de oxigênio (GUTTERIDGE, 1989).

Os RLO são difíceis de se detectar nos ensaios experimentais pela sua meia vida extremamente curta. Para superar essa dificuldade técnica, muitos métodos têm surgido baseados na detecção de produtos estáveis formados pela ação dos RLO em substratos específicos. Os hidroperóxidos são os produtos estáveis formados durante a peroxidação de lipídios insaturados, como ácidos graxos e colesterol. O TBARS, é um

dos métodos mais utilizados para estudos de peroxidação lipídica, e é baseado na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico. É um método simples e sensível para mensuração da peroxidação lipídica, embora não seja muito específico (KAPPUS, 1985).

## 2. Objetivos

---

Baseado nas considerações acima, o objetivo desse estudo foi avaliar a geração de EROs na fase aguda da imobilização, através da análise da concentração de TBARS.

## 3. Desenvolvimento

---

### Animais

Foram utilizados 24 ratos albinos Wistar com idade variando entre 2 e 3 meses, fornecidos pelo Biotério da UNIMEP. Os animais foram alimentados com ração (Purina para roedores) e água "*ad libitum*", submetidos a ciclos fotoperiódicos de 12h claro/escuro e distribuídos em 6 grupos experimentais (n=6): controle (C), imobilizado 1 dia (I1), 2 dias (I2), 3 dias (I3).

### Imobilização

Os ratos foram anestesiados e a pata posterior esquerda imobilizada com a órtese de resina acrílica, a qual manteve em posição neutra (90°) a articulação do tornozelo, deixando as articulações do joelho e quadril livres.

A órtese foi adaptada no membro posterior dos ratos, associada a uma cinta de PVC por dois rotadores laterais, os quais permitiram a sua movimentação. O conjunto, com aproximadamente 22 gramas de peso, não interferiu na deambulação do animal, havendo descarga de peso no membro imobilizado, sendo uma movimentação do membro em bloco, com movimentação ântero-posterior e lateral quadril.

### Amostragem

As amostras de plasma e músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e vermelho (GV) foram coletadas dos ratos após o sacrifício e encaminhadas para a determinação da concentração de TBARS.

### Análise estatística

A avaliação estatística foi feita através da análise de variância seguido do teste de Tukey sendo fixado o nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultados

---

As concentrações de TBARS não tiveram diferenças estatisticamente significativas, tanto nos músculos, quanto no plasma.

No músculo sóleo houve manutenção nas primeiras 24 horas de desuso, (média± epm, C:27,24± 2,22 e I1:26,69± 3,58,  $p>0,05$ ), elevação de 35,9% no segundo dia de desuso (média± epm, C:27,24± 2,22 e I2:37,02± 4,52,  $p>0,05$ ), e no terceiro dia houve redução de 15,9% em relação ao segundo dia e aumento de 14,2% em relação ao grupo controle, (média± epm, C:27,24± 2,22 e I3:31,13± 2,82,  $p>0,05$ ).

No gastrocnêmio branco e vermelho, houve nas primeiras 24 horas pequena redução equivalente a 3,17 e 11,56% respectivamente (média± epm, C:16,04± 1,13 e I1:15,53± 2,56,  $p>0,05$ ) e (média± epm, C:16,60± 1,61 e I1:14,68± 2,30,  $p>0,05$ ). No segundo dia de desuso houve redução de 13,15% no músculo gastrocnêmio branco (média± epm, C:16,04± 1,13 e I2:13,93± 0,56,  $p>0,05$ ), ao passo que no gastrocnêmio vermelho houve aumento de 10,1% (média± epm, C:16,60± 1,61 e I2:18,29± 3,68,  $p>0,05$ ). No terceiro dia, as concentrações de TBARS são equivalentes ao grupo controle sendo no gastrocnêmio porção branca (média± epm, C:16,04± 1,13 e I3:15,56± 1,27,  $p>0,05$ ) e na porção vermelha (média± epm, C:16,60± 1,61 e I3:16,78± 1,07,  $p>0,05$ ).

Quanto a concentração plasmática de TBARS houve aumento de 20% nas primeiras 24 horas (média± epm, C:15,99± 0,71 e I1:19,29± 1,31,  $p>0,05$ ), 60,5% no segundo dia de desuso (média± epm, C:15,99± 0,71 e I2:25,67± 3,38,  $p>0,05$ ) e 10,8% no terceiro dia (média± epm, C:15,99± 0,71 e I3:17,73± 1,93,  $p>0,05$ ).

Sabe-se que o músculo esquelético é um tecido com alta capacidade de adaptação, responde aos desafios ambientais e fisiológicos deflagrando mudanças no tamanho, no tipo de fibra e e também no metabolismo, (STEWART & RITTWEGGER, 2006).

O radical hidroxil é um dos mais reativos em sistemas biológicos, foi observado aumento nas concentrações desse radical em músculos de ratos atrofiados devido a suspensão de membros durante 12 dias (KONDO, NISHINO & ITOKAWA 1994).

Um estudo recente, analisou o comportamento enzimático muscular, mostrando que o status anti-oxidante é seriamente comprometido, possibilitando o aumento do estresse oxidativo durante períodos longos de desuso. Os animais foram mantidos com os membros posteriores suspensos durante 28 dias. Os resultados mostraram uma pequena redução (10%) na atividade da enzima Mn-SOD no músculo sóleo, e grande aumento (71,2%) na atividade da enzima CuZn-SOD. Simultaneamente foi observado redução nas enzimas catalase (54,5%) e glutathiona peroxidase (16,1%), anti-oxidantes responsáveis pela remoção dos hidroperóxidos, substâncias com alto poder de gerar EROs (LAWLER, SONG & DEMAREE, 2003).

Com o objetivo de aumentar a capacidade anti-oxidante e minimizar os danos oxidativos, pesquisadores submeteram ratos à 14 dias de imobilização associada a suplemento com anti-oxidante. Observaram que a capacidade anti-oxidante foi incrementada, porém os danos oxidativos não foram reduzidos, havendo atrofia muscular similar nos grupos controles e tratados (KOESTERER, DODD & SCOTT POWERS, 2002).

Há concordância entre os estudos, de que em períodos prolongados de desuso, há um desequilíbrio entre as defesas anti-oxidantes e a formação de EROs. Considerando que as principais alterações metabólicas na musculatura imobilizada, são desencadeadas nas fases iniciais do desuso, pode-se sugerir que os resultados desse estudo não mostraram diferença entre os grupos controle e imobilizados em decorrências de possíveis adaptações no sistema anti-oxidante muscular, de forma que à medida que a situação de desuso se torna crônica, a geração de EROs ocorre com maior intensidade e oprime as defesas anti-oxidantes.

O estudo das EROs na musculatura esquelética está na fase inicial, sendo assim, os mecanismos metabólicos e bioquímicos envolvidos na geração de EROs e no processo de hipotrofia muscular induzida por desuso, precisam ser melhor estudados. Nesse sentido há necessidade da realização de outros estudos que analisem diversos aspectos desses processos metabólicos.

## 5. Considerações Finais

---

O processo de imobilização nas condições estudadas não aumentou as concentrações de TBARS muscular, sugerindo que não há ocorrência de estresse oxidativo na fase aguda da imobilização. Tal fato sugere também que possivelmente o estresse oxidativo faça parte de respostas deflagradas a longo prazo, onde sua geração/ação torna-se efetiva.

## Referências Bibliográficas

---

GOODYEAR, L. J. et al. Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membrane of red and white skeletal muscle. **Am. J. Physiol**, v.261, p. 556-61, 1991. KAPPUS, H. Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. **In: Sies H, editor. Oxidative stress. London: Academic Press**. p.273-310, 1985. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 350p. JAGOE, R.T., GOLDBERG, A.L. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v.4, p. 183–90, 2001. BERNE, R. M.; LEVY M. N.. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 255p. JOHN, M.L.; WOOK, S.; SCOTT, R.D. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. **Free Radic Biol Med**. v. 35, n.1, p. 9-16, 2003. KOESTERER, T.J.; DODD, S.L.; SCOTT, P. Increased antioxidant capacity does not attenuate muscle atrophy caused by unweighting. **J Appl Physio.**, v. I 93, p. 1959–65, 2002. CROS, N. et al. Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. **Am J Physiol**. v. 276, n.(2 Pt 2), p.308-16, 1999. APPELL, H.J. Muscular atrophy following immobilisation. A review. **Sports Med** 10, n. 1, p. 42-58, 1990. IKEMOTO, M. et al. A relative high dose of vitamin E does not attenuate unweighting-induced oxidative stress and ubiquitination in rat skeletal muscle. **J Physiol Anthropol Appl Human Sci**. v. 21, n. 5 p. 257-63, 2002. KONDO, H.; NISHINO, K.; ITOKAWA, Y. Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. **FEBS Lett**. n. 349, v.2, p. 169-72, 1994. EDGERTON VR. et al. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. **Am J Phys Med Rehabil**. v. 81, n.11, p. 127-47, 2002. STEWART, C.E.; RITTWEGER, J. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. **J Musculoskelet Neuronal Interact**. v.6, n. 1, p. 73-86. 2006. RICHARDSON, J.M. et al. Differential regulation of glucose transport activity and expression in red and white skeletal muscle. **J. Biol. Chem**. v. 266, p. 12690-694, 1991. YU, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**. v. 74, p. 139-62, 1994.