

**ANÁLISE PROTEICA E ESTRUTURAL DA MUSCULATURA
DIAFRAGMÁTICA E DO FÍGADO DE RATAS PÓS-
IMOBILIZAÇÃO COM TERAPIA AQUÁTICA**

*(Protein and structural analysis of diaphragmatic musculature
and liver of post-immobilization rats with aquatic therapy)*

Aline Dourado VIEIRA¹; Flávia Helena Germano BEZERRA¹; Jéssica Sousa VALENTIM¹; Raquel Magalhães Castelo Branco CRAVEIRO²; Carla Andressa Andrade dos SANTOS²; Karla Camila Lima de SOUZA²; Vânia Marilande CECCATTO²; Francisco Fleury Uchoa SANTOS JÚNIOR^{1,2*}

¹Centro Universitário Estácio do Ceará, Rua Eliseu Uchôa Beco, 600 - Fortaleza, CE, CEP: 60810-270 Fortaleza/CE; ²Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, Ce.

RESUMO

A imobilização é uma prática comum na reabilitação de lesões musculoesqueléticas, mas que pode, por sua vez, ocasionar, adicionalmente, diversos danos à estrutura inicialmente comprometida. Dentre os recursos empregados para reverter os danos oriundos da imobilização, a principal foi a terapia aquática que, aliada aos efeitos benéficos da imersão em água auxilia nos ajustes fisiológicos do corpo. O objetivo do presente estudo foi analisar o conteúdo proteico e estrutural da musculatura diafragmática e hepática de ratas pós-imobilização com terapia aquática. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, sob o protocolo nº 1122178 de 05/10/2017. Foram utilizadas 32 ratos, fêmeas, Wistar, divididas em quatro grupos: Controle (CTR), Imobilizado (I), Terapia Aquática (TA) e Imobilizado/Terapia Aquática (ITA). A imobilização ocorreu no membro posterior direito, incluindo a pelve, o quadril, fêmur, o joelho (extensão), tibia e tornozelo (flexão plantar), durante duas semanas. A terapia aquática ocorreu durante seis dias por semana, ao longo de duas semanas. Após esse período, os animais foram eutanasiados e as estruturas de interesse dissecadas: diafragma e fígado. Para avaliação muscular e hepática, foi realizada uma dosagem de proteínas. O trofismo muscular foi calculado pela razão entre o peso úmido do músculo diafragmático (mg) e o peso corporal final (g) dos animais. Os dados foram analisados por Anova-One-Way, com $p < 0,05$ e teste de *Brown-Forsythe* e *Kruskal-Wallis*, além de uma correlação de *Pearson*. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. O processo de não utilização por duas semanas, associados ao tratamento de terapia aquática não foi capaz de alterar significativamente o conteúdo proteico e estrutural da musculatura diafragmática e das reservas hepáticas.

Palavras-Chaves: Imobilização, diafragma, fígado.

*Endereço para correspondência:
drfleuryjr@gmail.com

ABSTRACT

Immobilization is a common practice in the rehabilitation of musculoskeletal injuries, but this may in turn cause several damages to the initially compromised structure. Among the resources used to reverse the damage from immobilization, the main one was the aquatic therapy, combined with the beneficial effects of immersion in water, helps with the physiological adjustments of the body. The objective of the present study was to analyze the protein and structural content of the diaphragmatic and hepatic muscles of post-immobilization rats with aquatic therapy. The project was approved by the Committee of Ethics for the Use of Animals of the State University of Ceará, under the protocol nº 1122178 of 05/10/2017. Thirty-two female Wistar rats were divided into four groups: Control (CTR), Immobilized (I), Aquatic Therapy (TA) and Immobilized with Aquatic Therapy (ITA). Immobilization occurred in the right hind limb, including the pelvis, hip, femur, knee (extension), tibia, and ankle (plantar flexion) for two weeks. Aquatic therapy occurred for six days a week over two weeks. After this period the animals were euthanized and the structures of interest were dissected: diaphragm and liver. For muscular and hepatic evaluation, protein quantity was evaluated. Muscle trophism was calculated by the ratio of wet diaphragmatic muscle weight (mg) to the final body weight (g) of the animals. The data were analyzed by Anova-one-Way, with $p < 0.05$ and test of Brown-Forsythe and Kruskal-Wallis, Pearson correlation. Results were expressed as the average \pm the standard error of measurement. It was found that the process of not using associated with aquatic therapy treatment for two weeks was not able to significantly alter the protein and structural content of the diaphragmatic muscles and liver reserves.

Keywords: Immobilization, diaphragme, liver.

INTRODUÇÃO

A imobilização é uma prática muito comum na reabilitação de lesões musculoesqueléticas. Porém, são inúmeros os efeitos deletérios oriundos desse procedimento no membro comprometido, assim como em estruturas adjacentes aos locais das lesões (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2017). Dentre os danos, de ordem estrutural e funcional, foi possível se destacarem os seguintes: lesões ligamentares (CARVALHO *et al.*, 2008), articulares (BERTOLINI *et al.*, 2010), musculares, ósseas (PONTINHO *et al.*, 2008) e sistêmicas (SANTOS JÚNIOR, *et al.*, 2017; FORTES *et al.*, 2017).

Nesse contexto, são empregados diversos recursos ortopédicos, para reverter os danos provocados pelo desuso no sistema muscular, assim como em outras estruturas acometidas por esse processo, tais como: a eletroestimulação muscular (DURINGAN *et al.*, 2006), exercício excêntrico e alongamento (PUCCIARELLI *et al.*, 2016). Dentre esses recursos, se destaca a terapia aquática, que alia os efeitos benéficos da imersão em água (CANDEROLO e CAROMANO, 2007; CARREGARO e TOLEDO, 2008) no ajuste das desordens fisiológicas desencadeadas pela imobilização (GOMES *et al.*, 2016).

Portanto, o presente trabalho justificou-se por investigar as lacunas existentes na literatura, no que tange aos efeitos da terapia aquática na propriedade proteica do fígado e diafragma, assim como sua ação em situações de trofismo muscular.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE), protocolo nº 1122178 de 05/10/2017; sendo respeitados todos os princípios éticos sobre experimentação e manipulação animal.

Utilizou-se trinta e duas ratos, fêmeas, Wistar, idade média de 20 semanas, massa corporal entre 200 ± 15 g, oriundos do biotério da UECE. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12 / 12h), em ambiente com temperatura controlada entre 22 a 25 °C, recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, cada um consistindo em (n=8): Controle (CTR), Imobilizado (I), Terapia Aquática (TA) e Imobilizado/Terapia Aquática (ITA).

A imobilização foi realizada, conforme modelo proposto por Santos Júnior *et al.*, (2010). Inicialmente, os animais foram anestesiados com Cetamina 60mg/kg e Xilasina 8mg/kg e, depois, foram utilizadas ataduras de algodão, com 4 cm de largura nas articulações, para prevenir úlceras de pressão. Posteriormente, os animais foram enfaixados com esparadrapo impermeável, com tiras diferentes de 5 cm de largura e 15 cm de comprimento, para o membro e o tronco. O membro posterior direito foi imobilizado, incluindo a pelve, quadril, fêmur, o joelho (extensão), tibia e tornozelo (flexão plantar), durante duas semanas.

A terapia aquática foi realizada dentro de um recipiente de plástico (PVC), com volume aproximado de 60 litros de água, a uma temperatura média de 33 °C. A fim de evitar flutuação do animal, foi utilizada uma carga equivalente a 8,0% da massa corporal, atada ao dorso. Os exercícios na água foram realizados no período matutino, durante seis dias por semana, ao longo de duas semanas, iniciando com 3 minutos, com acréscimo de três minutos por dia, chegando à duração de 36 minutos no último dia de treino, conforme ilustrado na (Tab. 01) (GOMES *et al.*, 2016).

Tabela 01: Protocolo do tempo da terapia aquática.

	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado
1ª semana	3 min.	6 min.	9 min.	12 min.	15 min.	18 min.
2ª semana	21 min.	24 min.	27 min.	30 min.	33 min.	36 min.

Fonte: Adaptada (GOMES *et al.*, 2016)

No final do período experimental, os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico, 150mg/kg, de acordo com a massa corporal e, em seguida eutanasiados, por decapitação, para posterior dissecação do músculo diafragmático e do fígado. As estruturas citadas foram pesadas em balança de precisão (0,01g).

O trofismo muscular foi calculado, pela razão entre o peso úmido do músculo diafragma (mg) e o peso corporal final (g) dos animais (ROCHA *et al.*, 2010).

Para análise proteica do fígado e do diafragma, após dissecação, foram armazenados em nitrogênio líquido. Posteriormente, porções das estruturas citadas foram homogeneizadas em tampão fosfato (pH=7,4).

A dosagem de proteínas foi realizada, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a determinação de proteínas totais em uma amostra. Em uma placa de 96 poços, preparou-se a curva padrão com albumina (1 mg/mL) em triplicata e, em seguida, o poço teste (150 µL de reagente Bradford e amostra). Uma vez estabelecido o valor da amostra, distribuíram-se os diferentes grupos nos poços em duplicata, com volume final de 150 µL, colocando-se, primeiramente, o reagente Bradford (maior quantidade) e, por último, a amostra (menor quantidade). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (VersaMax™ ELISA Microplate Reader), num comprimento de onda de 595 nm.

Para a análise estatística, foi utilizada a média ± erro padrão da média, comparando-se os quatro grupos diferentes. Usou-se a análise de variância Anova-One-Way com teste de *Brown-Forsythe* e *Kruskal-Wallis* e teste de correlação de *Pearson*, com nível de significância estatística considerada $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o software *GraphPad Prism* versão 7.0, San Diego Califórnia USA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

É consensual na literatura que durante o processo de imobilização, o membro em desuso sofre várias alterações estruturais, tais como: atrofia muscular (GOMES *et al.* 2016), danos na estrutura e propriedade óssea (OZAKI *et al.*, 2014), assim como alterações proteicas cerebrais e muscular (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2015); além de efeitos adversos em órgãos secundários, tais como o fígado (FORTES *et al.*, 2017). Entretanto, no presente estudo verificou-se que não houve perda proteica muscular (Fig. 1A) e hepática (Fig. 1B), corroborado pela correlação de *Pearson* entre os parâmetros, que não identificaram correlação linear entre as proteínas do fígado e do diafragma (Fig. 2) com ($r = 0,04282$).

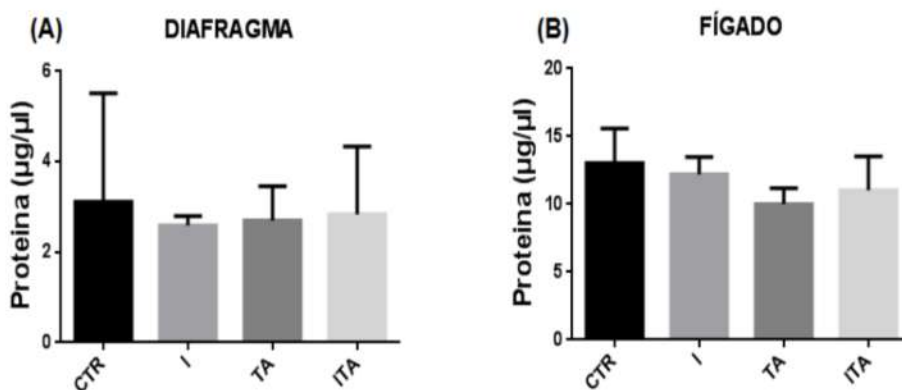


Figura 1: Dosagem de proteína do músculo diafragma e do fígado de ratas.

CTR = Controle; I = Imobilizado; TA = Terapia aquática; ITA = imobilizado/terapia Aquática. (Fig. 1A) temos a dosagem de proteínas no diafragma: CTR ($3,11 \pm 0,84$), I ($2,59 \pm 0,077$), TA ($2,70 \pm 0,31$) e ITA ($2,83 \pm 0,53$), $p = 0,232$. (Fig. 1B) vemos a dosagem de proteínas do fígado: CTR ($13,03 \pm 0,90$), I ($12,21 \pm 0,48$), TA ($10,0 \pm 0,48$) e ITA ($11,04 \pm 0,88$), $p = 0,0570$. Não houve significância estatística entre os quatro grupos.

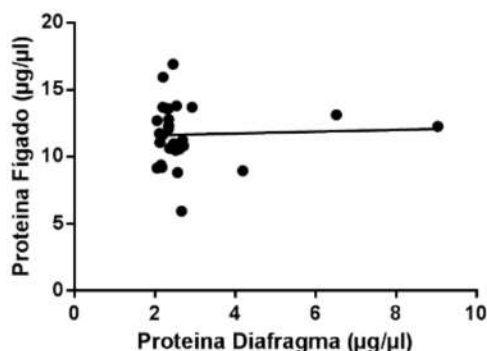


Figura 2: Correlação entre a dosagem de proteínas de fígado e do diafragma de ratas

Valor do teste de Correlação de *Pearson* $r = 0,04282$

Verificou-se, também, que não houve diferenças estatisticamente significativas no trofismo muscular do diafragma dos grupos analisados (Fig. 3).

Os referidos resultados divergiram com os achados relatados na literatura, que descreveram perda de conteúdo proteico no músculo diafragmático, na ordem de 37,4% em animais imobilizados; assim como um ganho de proteínas de aproximadamente 45% em animais submetidos ao tratamento de terapia aquática (Fig. 1A) (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2012).

Achados semelhantes ao de Santos Júnior e colaboradores (2012) foram reportados anteriormente e caracterizaram o desuso muscular como um processo de redução no tamanho de fibras, conteúdo de proteínas, área da secção transversa e diminuição da força muscular (MACHILDA e BOOTH; 2004; ZHANG *et al.*, 2007); mostrando que a diminuição da síntese e o aumento da degradação proteica relacionadas a esse processo favoreceram a perda total de proteínas no músculo correspondente e estruturas adjacentes, além de causar atrofia muscular (ZHANG *et al.*, 2007; SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2017).

Fortes e colaboradores (2017) relataram que a imobilização causou depleção das reservas energéticas do fígado e que o tratamento com terapia aquática recompôs as reservas hepáticas. Stein e Wade (2005) verificaram um aumento expressivo de enzimas glicogênicas nas células hepáticas, indicio de um maior consumo energético e, conseqüentemente, degradação proteica em animais imobilizados. Os referidos resultados diferiram dos achados encontrados neste estudo (Fig. 1B).

É provável que a velocidade de síntese proteica (que começa a declinar com até 6 horas após o processo de imobilização) não tenha sido suficiente para causar perda de proteínas nos animais analisados neste estudo (Fig. 1A e 1B) e, conseqüentemente, trofismo muscular (Fig. 3) (FALEMPIN e MOUNIER, 1998). No que tange aos efeitos do tratamento da terapia aquática na imobilização, observou-se que a intensidade e a duração do protocolo não foi capaz de gerar alterações expressivas nos níveis proteico e estrutural.

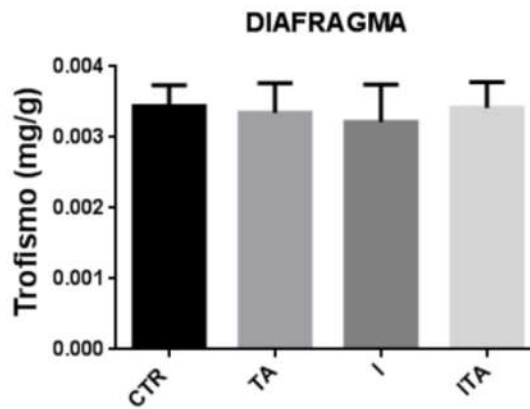


Figura 3: Trofismo muscular da musculatura diafragmática de ratas.

CTR = Controle; I = Imobilizado; TA = Terapia aquática; ITA = Imobilizado/terapia Aquática.

(Fig. 3) temos o trofismo muscular do diafragma: CTR (0,0034± 0,0001), I (0,0032±0,00019), TA (0,0033±0,00017) e ITA (0,0034±0,00012), p 0,7156. Não houve significância estatística entre os quatro grupos.

CONCLUSÃO

A imobilização é um recurso terapêutico, muito utilizado no tratamento de lesões musculoesqueléticas; contudo, pode desencadear diversos danos estruturais na musculatura lesada, assim como comprometimento proteico. Uma terapia aquática surge como um recurso para amenizar ou reverter as complicações oriundas do desuso. Entretanto, verificou-se no presente estudo que duas semanas de imobilização não foram o suficiente para recuperar a estrutura muscular do diafragma, assim como o conteúdo proteico do referido músculo e do fígado, devendo serem testados períodos de tempos maiores que o referido período.

REFERÊNCIAS

BERTOLINI, S.M.M.G.; OLIVEIRA, P.D.; CARARO, D.C. Estudos morfométrico do músculo sóleo de ratos da linhagem Wistar pós-imobilização articular. *Acta Scientiarum Health Science*, v.32, n.1, p.23-27, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, v.72, n.7, p.248-54, 1976.

CANDEROLO, J.M.; CAROMANO, F.A. Efeitos de um programa de hidroterapia na flexibilidade e na força muscular de idosas. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, v.11, n.4, p.303-309, 2007.

CARREGARO, R.L.; TOLEDO, A.M. Efeitos fisiológicos e evidências científicas da eficácia da fisioterapia aquática. *Movimenta*, v.1, n.1, p.23-27, 2008.

CARVALHO, L.C.; SHIMANO, A.C.; PICADO, C.H.F. Estimulação elétrica neuromuscular e o alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado. *Acta Ortopédica Brasileira*, v.16, n.3, p.161-164, 2008.

DURIGAN, J.L.Q.; NCANCELLIERO, K.M.; DIAS, C.N.K.; SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; POLACOW, M.L.O. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização aguda associado à estimulação elétrica neuromuscular. *Fisioterapia em Movimento*, v.19, n.2, p.117-126, 2006.

FALEMPIN, M.; MOUNIER, Y. Muscle atrophy associated with microgravity in rat: basic data for countermeasures. *Acta Astronáutica*, v.42, p.489-502, 1998.

FORTES, J.P.A.; CARVALHO, F.L.; ALVES, J.O.; CHAVES, M.M.G.F.; CARNEIRO, M.R.A.; SOUZA, K.C.L.; SANTOS JÚNIOR, F.F.U.; CECCATTO, V. M. Hepatic glycogen levels in female rats submitted to aquatic therapy after muscle disuse, *Motricidade*, v.13, n.3, p.53-58, 2017.

GOMES, N.M.A.; SOUZA, K.C.L.; RABELO, M.; FORTES, J.P.A.; BARBOSA, L.S.; CRAVEIRO, R.M.C.B.; VASCONCELOS FILHO, F.S.L.; SANTOS JÚNIOR, F.F.U.; CECCATTO, V.M. Aquatic therapy in bone mineral density in rats after paw disuse by Immobilization. *International Journal of Therapies & Rehabilitation Research*, v.5, n.5, p.161-169, 2016.

MACHIDA, S.; BOOTH, F.W. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Medicine Science Sports Exercise*, v.36, n.1, p.52-59, 2004.

OZAKI, G.A.T., KOIKE, T.E., CASTOLDI, R.C., GARÇON, A.A.B., KODAMA, F. Y., WATANABE, A.Y., JOB, A.E., LOUZADA, M.J.Q., CAMARGO, R.C.T., CAMARGO FILHO, J.C.S. Efeitos da remobilização por meio de exercício físico sobre a densidade óssea de ratos adultos e idosos. *Motricidade*, v. 10, n. 3, p. 71-78, 2014.

PONTINHO, D.; BOIN, V.G.; BERTOLINI, G.R.F. Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocado pela imobilização e remobilização em ratos Wistar. *Revista Brasileira Medicina do Esporte*, v.14, n.5, p.408-411, 2008.

PUCCIARELLI, M.L.R.; MATTIELLO, S.M.; MARTINEZ, E.Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A.C. Exercício excêntrico e alongamento para músculos flexores plantares aplicados durante 21 dias após imobilização não modificam o tecido não contrátil. *Fisioterapia & Pesquisa*, v.23, n.2, p.118-123, 2016.

ROCHA, W.A.; GOBBI, G.A.; ARAÚJO, V.D.F.; ARAUJO, V.F.; SANTUZZI, C.H.; COUTINHO, G.C.; NOGUEIRA, B.V. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membros posterior. *Revista Brasileira Medicina do Esporte*, v.16, n.6, p.450-454, 2010.

SANTOS JÚNIOR, F.F.U.; SOUZA, K.C.L.; SERRA, D.S.; CECCATTO, V.M., CAVALCANTE, F.S.A. Analysis of pulmonary function and micromechanics structure after 14 days of movement restriction in female rats, *Fisioterapia e Pesquisa*, v.24, n.2, p.205-210, 2017.

SANTOS JÚNIOR, F.F.; SOUZA, A.L.O.; FRANCO, F.G.S.; ANDRÉ, N.M.; CECCATTO, V.M. Reabilitação diafragmática de ratos pós-imobilização com terapia aquática. *Fisioterapia Brasil*, v.13, n.6, p.419-423, 2012.

SANTOS JÚNIOR, F.F.U.; ALVES, J.S.M.; MACHADO, A.A.N.; CARLOS, P.S.; FERRAZ, A.S.M.; BARBOSA, R.; LEAL-CARDOSO, J.H.; CECCATTO, V.M. Alterações morfométricas em músculo respiratório de ratos submetidos à imobilização de pata. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.16, n.3, p.215-218, 2010.

STEIN, T.P.; WADE, C.E. Metabolic consequences of muscle disuse atrophy. *The Journal of Nutrition*, v.135, n.7, p.1824S-1828S, 2005.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses*, v.69, p.310-321, 2007.