

AVALIAÇÃO DE FORÇA E RESISTÊNCIA MUSCULAR DE CAMUNDONGOS APÓS PROTOCOLO DE ATROFIA POR DESUSO

(Evaluation of muscle strength and resistance of mice after protocol of atrophy due disuse)

Ayala Nathaly Gomes da SILVA; João Ricardhis Saturnino de OLIVEIRA;
Álvaro Nóbrega de Melo MADUREIRA; Vera Lúcia de Menezes LIMA*

Laboratório de Lipídeos e Aplicação de Biomoléculas em Doenças Prevalentes e Negligenciadas,
Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária,
Recife/PE. CEP: 50.670-901. *Email: lima.vera.ufpe@gmail.com

RESUMO

Redução na massa e na função muscular resultantes da inatividade por períodos prolongados caracterizam a atrofia por desuso. Devido à proximidade anatômica e fisiológica entre camundongos e seres humanos, estudos experimentais com esse modelo animal têm sido realizados para compreender a atrofia por desuso. Entretanto, há especificidades funcionais entre as duas espécies, dada às marchas quadrúpede e bípede. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade física de camundongos após protocolo de atrofia por desuso por imobilização de membros posteriores. 12 camundongos albino suíços foram divididos em 2 grupos: controle e atrofia. Após 14 dias de imobilização, foram propostos 2 métodos avaliativos: capacidade máxima de carregamento voluntária (CMCV) e nado forçado, além de avaliação da massa corporal. Não houve diferença significativa entre o peso corporal e CMCV, enquanto o tempo de nado do grupo controle foi 10 vezes maior em relação ao grupo atrofia ($p < 0,05$). Desta forma, conclui-se que músculos esqueléticos de camundongos após desuso apresentam redução da capacidade máxima ao esforço, no entanto alguns métodos avaliativos são mais sensíveis para detectar mudanças.

Palavras-chave: Murino, funcionalidade, bípede, quadrúpede

ABSTRACT

Reduction in muscle mass and function resulting from prolonged inactivity characterize disuse atrophy. Due to the anatomical and physiological proximity between mice and humans, experimental studies with this animal model have been carried out to understand disuse atrophy. However, there are functional specificities between the two species, given the quadrupedal and bipedal gaits. Thus, this study aimed to evaluate the physical capacity of mice after a protocol of atrophy by disuse by immobilization of the hind limbs. 12 Swiss albino mice were divided into 2 groups: control and atrophy. After 14 days of immobilization, 2 evaluation methods were proposed: maximum voluntary carrying capacity (MVCC) and forced swimming, in addition to body mass assessment. There was no significant difference between body weight and MVCC, while the swimming time of the control group was 10-fold longer compared to the atrophy group ($p < 0.05$). Thus, it is concluded that the skeletal muscles of mice after disuse present a reduction in functional capacity; however, some evaluation methods are more sensitive to these changes than others.

Keywords: Murine, functionality, biped, quadruped

INTRODUÇÃO

Camundongos são animais comumente usados em modelos experimentais por possuírem analogia anatômica e fisiológica com humanos. A análise da estrutura e função de músculos esqueléticos homólogos dos membros de camundongos e humanos permitem correlação com a clínica de doenças neuromusculares, por exemplo. Assim, estudos sobre arquitetura, geometria, propriedades contráteis e especificidades funcionais dos músculos dos membros posteriores (CHARLES *et al.*, 2016) e anteriores de camundongos (MATHEWSON

et al., 2012) tem se desenvolvido nas últimas décadas para embasar estudos nas ciências biológicas, médicas e veterinárias. No entanto, por vezes, peculiaridades das espécies não são levadas em consideração e extrapolações de resultados podem trazer prejuízos para ambas as populações.

A arquitetura muscular é definida como o arranjo das unidades motoras, as fibras musculares, em relação ao seu eixo gerador de força, determinando a função muscular. A arquitetura e geometria muscular se adaptam à função desempenhada (LIEBER e WARD, 2011). Os músculos distais dos membros anteriores dos camundongos, por exemplo, são especializados em grande produção de força para sustentação de peso, uma vez que possuem marcha quadrúpede, enquanto em bípedes esses músculos são adaptados para as habilidades manipulativas (MATHEWSON *et al.*, 2012).

A função e o desempenho muscular são alterados pelo grau de atividade física. Períodos prolongados de inatividade do músculo esquelético ou descarregamento mecânico podem resultar em redução de massa e tamanho muscular, desencadeando um processo de atrofia por desuso e comprometendo a geração de força pelo músculo esquelético, acarretando a redução da qualidade de vida e maior morbidade e mortalidade na população hospitalizada (BODINE, 2013; GAO *et al.*, 2018). Desse modo, o objetivo deste estudo foi verificar alterações no desempenho muscular de camundongos após um protocolo de atrofia por desuso, observando características funcionais e adaptativas necessárias a espécie, que divergem de seres humanos e devem ser consideradas em estudos experimentais com esse modelo animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Doze camundongos albino suíço, machos, com 60 dias de vida, foram obtidos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O tempo de adaptação dos animais foi de uma semana com acesso a comida e bebida *ad libitum* em um ambiente a 22 °C de temperatura e ciclo 12h-on/12h-off de iluminação. Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos, controle e atrofia, sendo 6 animais por grupo.

Os animais do grupo controle não foram submetidos ao protocolo de atrofia muscular, mantendo apenas suas atividades regulares na gaiola. O grupo atrofia foi submetido a um protocolo de atrofia por desuso através de imobilização das patas traseiras. Todos os experimentos que constam neste projeto tiveram aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa com Animais do Centro de Biociências da UFPE, registro nº 0014/2021. Ademais, para garantia do bem-estar e devidos cuidados, todo o processo seguiu os preceitos da ARRIVE para pesquisas com animais (KILKENNY *et al.*, 2010) e após os testes, os animais foram eutanasiados com xilazina (30mg/kg, *i.p.*) e cetamina (300mg/kg, *i.p.*), e encaminhado para a central de processamento de material biológico da UFPE.

Protocolo de atrofia por desuso

Os animais que pertencentes ao grupo atrofia, passaram por metodologia de atrofia por desuso por meio de imobilização das patas traseiras (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2010). Esta metodologia surgiu para mimetizar situações de repouso absoluto e imobilização de seres

humanos em modelo experimental (COUTINHO *et al.*, 2002; FRIMEL *et al.*, 2005). Estudos indicam que a imobilização causa aumento da proteólise (KRAWIEC *et al.*, 2005) e redução da atividade muscular (COUTINHO *et al.*, 2002), o que causa perda progressiva de massa, força e função dos músculos (CARON *et al.*, 2009). Brevemente, os membros posteriores foram imobilizados por atadura elástica compressiva e aderente por 14 dias para garantir a atrofia muscular. A imobilização era revisada a cada 48h. Durante o protocolo de atrofia, os animais permaneceram na gaiola em suas atividades normais. Além disso, os animais foram observados para situação de estresse, a partir da observação de alterações comportamentais, no padrão de ingestão alimentar e hídrica, e demais sinais de estresse. Caso presentes, as devidas medidas para manejo seriam realizadas.

Avaliação do peso corporal: Todos os camundongos tiveram seu peso corporal mensurado em gramas (g) no início e ao final do protocolo de atrofia muscular em balança semi-analítica (Bel Engineering Mark 330).

Avaliação do condicionamento físico aeróbico: 2 horas após a retirada da imobilização nos membros posteriores, os animais passaram por um teste de nado forçado até a exaustão para medição da capacidade aguda ao exercício, de acordo com adaptações de protocolos previamente descritos (JUNG *et al.*, 2021). Os animais foram colocados para nadar individualmente em câmaras de 35cm de altura e 25cm de diâmetro com água à temperatura de 25 °C aproximadamente para avaliação do tempo de resistência ao exercício. Para evitar a flutuação dos animais durante o teste foi fixado com fita adesiva um peso mínimo de 5% de sua massa distalmente em suas caudas. A exaustão dos animais foi considerada quando os mesmos não retornaram à superfície dentro de 6 segundos, sendo retirados imediatamente da câmara, secados com toalha aquecida (30 °C) e colocados para repousar em suas gaiolas. O tempo entre a imersão e a exaustão foi cronometrado e registrado.

Capacidade máxima de carregamento voluntária (CMCV): A CMCV foi mensurada de acordo com adaptação de protocolos previamente descritos (MINUZZI *et al.*, 2019), dois dias após o protocolo de atrofia. Foi utilizada uma escada de subida vertical de 70cm, com espaço de 1,5cm entre os degraus, e inclinação de 80°. Houve três dias de familiarização com subidas sem carga para estimular a subida voluntária dos animais durante o teste. O ponto de partida era a base da escada. A tentativa de subida foi considerada válida quando o animal percorreu a distância proposta, de 70cm. A tentativa inicial do teste foi realizada com incremento de 25% do peso corporal do animal fixado na sua cauda, e adição posterior de 3g a cada tentativa, até que não fosse mais possível ao animal completar todo o percurso. O dispositivo de carregamento foi um tubo de Falcon de 50mL preenchido com o peso incremental de cada tentativa e fixado na cauda do animal com fita adesiva. Para manter constante o braço de momento de cada tentativa e entre os animais, determinou-se fixar a carga no terço proximal das caudas. Quando necessário, os animais foram estimulados com pinçamento manual do examinador em suas caudas para iniciar e/ou continuar a subida. A cada tentativa de subida, o animal era retirado da escada e deixado descansar por 5 minutos em sua gaiola. A carga máxima com a qual o animal conseguiu completar uma tentativa foi considerada sua CMCV.

Análise Estatística

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e heterogeneidade de variância para verificar os pressupostos da análise de variância. Em seguida, média e desvio padrão foram submetidos ao Teste t no software GraphPad Prism, versão 4.2. Para diferença estatística, $p < 0,05$ (5%) foi considerado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corpóreo entre os grupos antes e após o protocolo de atrofia não foi significativamente alterado (Tab. 01), assim como não houve observação de mudança no padrão de ingesta alimentar e hídrica. Protocolo anterior de atrofia muscular por imobilização de membros posteriores de camundongos já havia demonstrado redução na ingestão alimentar e no peso úmido de músculos imobilizado, consequentemente, reduzindo o peso corporal dos animais submetido a atrofia (ONDA *et al.*, 2016). A perda de peso úmido, ou seja, de massa muscular durante atrofia muscular por desuso ocorreria devido ao desequilíbrio entre síntese e degradação proteica em resposta a descarga e atividade neural reduzidas entre o 7º e 14º dia de imobilização, reduzindo a área de secção transversa muscular e, consequentemente, a capacidade do músculo gerar força (BODINE, 2013; GAO *et al.*, 2018).

Tabela 01: Variação da massa corporal de camundongos antes e após protocolo de atrofia por desuso das patas traseiras.

GRUPO	PESO (g)	
	Pré-atrofia	Pós-atrofia
Controle	31,38g±0,83	35,53g±1,0
Atrofia	32,81g±2,25	31,18g±3,09

Dados expressos como média ± desvio padrão, Test t ($p > 0,05$).

A CMCV entre os grupos também não foi significativamente alterada. Em contrapartida, o tempo de nado forçado entre os grupos foi alterado significativamente (Fig. 01).

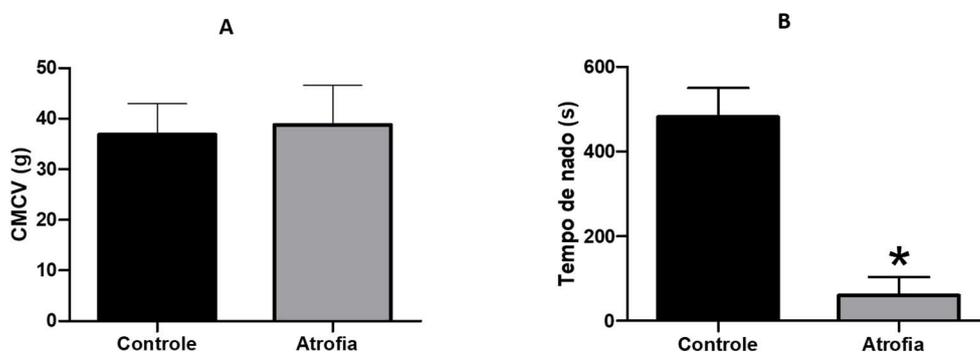


Figura 01: Resposta de camundongos à avaliação de força e resistência após protocolo de atrofia por desuso das patas traseiras.

Obs.: Capacidade máxima de carregamento voluntário (CMCV). A: CMCV entre os grupos, $p = 0,96$, Teste t; B: teste do nado forçado, $*p < 0,01$, Teste t.

Durante o teste de CMCV, foi observado pelos examinadores que os camundongos utilizam os membros anteriores na geração de força para a subida e carregamento. Estudo anterior se refere ao protocolo como escalada (MINUZZI *et al.*, 2019), em analogia ao movimento de bípedes em subir superfícies angulares com membros superiores dando propulsão ao corpo. Além disso, a marcha quadrúpede requer que os membros anteriores dos camundongos sejam capazes de grande produção de força, pois são designados para estabilização e sustentação de peso (MATHEWSON *et al.*, 2012). Desse modo, a realização de CMCV pode ser utilizada para avaliação global de força e potência muscular, porém possui pouca sensibilidade para a avaliação de mudanças em extremidades ou grupamentos musculares específicos.

Outra questão é que diferentes tipos de fibras musculares sofrem atrofia por diferentes mecanismos de sinalização celular. Fibras do tipo I são mais suscetíveis ao processo de atrofia por desuso, enquanto as fibras do tipo II teriam proteção a este tipo de atrofia (WANG e PESSIN, 2013). Paralelamente, o desuso causa um deslocamento das fibras do tipo I para fibras do tipo II (CICILIOT *et al.*, 2013). O teste de condicionamento físico aeróbico com nado forçado é um teste de avaliação de resistência muscular (JUNG *et al.*, 2021), enquanto o teste da CMCV avalia a força de carregamento dos animais (MINUZZI *et al.*, 2019). Desse modo, os achados sugerem que CMCV foi adequado para avaliar a potência muscular, ou seja, manutenção funcional das fibras do tipo II, principalmente. O baixo desempenho dos animais do grupo atrofia no teste de nado forçado demonstra baixa resistência muscular à fadiga, indicado que provavelmente houve perda funcional das fibras do tipo I, sendo este teste mais sensível para avaliar a função desse tipo de fibra.

CONCLUSÕES

O sistema musculoesquelético de camundongos possui homologia ao dos seres humanos, mas divergem na função, uma vez que há peculiaridades, como o padrão de marcha. Métodos de avaliação funcional muscular *in vivo* realizados neste estudo demonstraram que a avaliação de força em animais quadrúpedes requer ferramentas específicas para a extremidade ou grupamento a ser analisado, pois a biomecânica do animal pode reduzir a sensibilidade do teste. Na avaliação de declínio funcional, testes aeróbicos parecem ser mais sensíveis a alterações da função muscular em modelo experimental com camundongos. Assim, estudos devem escolher cuidadosamente o método avaliativo de acordo com a variável de função muscular desejada, para que não corra o risco de não detectar alterações.

REFERÊNCIAS

- BODINE, S.C. Disuse-induced muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.45, n.10, p.2200-2208, 2013.
- CARON, A.Z.; DROUIN, G.; DESROSIERS, J.; TRENSZ, F.; GRENIER, G. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. **Journal of Applied Physiology** (1985), v.106, n.6, p.2049-2059, 2009.

- CHARLES, J.P.; CAPPELLARI, O.; SPENCE, A.J.; HUTCHINSON, J.R.; WELLS, D.J. Musculoskeletal Geometry, Muscle Architecture and Functional Specialisations of the Mouse Hindlimb. **Plos ONE**, v.11, n.4, p.1-21, 2016.
- CICILIOT, S.; ROSSI, A.C.; DYAR, K.A.; BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.45, n.10, p.2191-2199, 2013.
- COUTINHO, E.L.; GOMES, A.R.S.; FRANÇA, C.N.; SALVINI, T.F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.1329-1332, 2002.
- FRIMEL, T.N.; KAPADIA, F.; GAIDOSH, G.S.; LI, Y.; WALTER, G.A.; VANDENBORNE, K. A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. **Muscle & Nerve**, v.32, p.672-674, 2005.
- GAO, Y.; ARFAT, Y.; WANG, H.; GOSWAMI, N. Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and Potential Countermeasures. **Frontiers in Physiology**, v.20, n.9, p.235-243, 2018.
- JUNG, S.; KIM, S.H.; JEUNG, W.; RA, J.; HEO, K.; SHIM, J.J.; LEE, J.L. Fermented antler improves endurance during exercise performance by increasing mitochondrial biogenesis and muscle strength in mice. **Applied Sciences**, v.11, n.12, p.5386-, 2021.
- KILKENNY, C.; BROWNE, W.; CUTHILL, I.C.; EMERSON, M.; ALTMAN, D.G. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v.160, n.7, p.1577-1579, 2010.
- KRAWIEC, B.J.; FROST, R.A.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S.; LANG, C.H. Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. **American Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.289, n.6, p.969-980, 2005.
- LIEBER, R.L.; WARD, S.R. Skeletal muscle design to meet functional demands. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v.366, n.1570, p.1466-1476, 2011.
- MATHEWSON, M.A.; CHAPMAN, M.A.; HENTZEN, E.R.; FRIDÉN, J.; LIEBER, R.L. Anatomical, architectural, and biochemical diversity of the murine forelimb muscles. **Journal of Anatomy**, v.221, n.5, p.443-451, 2012.
- MINUZZI, L.G.; KUGA, G.K.; BREDA, L.; GASPAR, R.C.; MUÑOZ, V.R.; PEREIRA, R.M.; BOTEZELLI, J.D.; SILVA, A.S.R.; CINTRA, D.E.; MOURA, L.P.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. Short-term resistance training increases APPL1 content in the liver and the insulin sensitivity of mice fed a long-term high-fat diet. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.128, n.01, p.30-37, 2019.
- ONDA, A.; KONO, H.; JIAO, Q.; AKIMOTO, T.; MIYAMOTO, T.; SAWADA, Y.; SUZUKI, K.; KUSAKARI, Y.; MINAMISAWA, S.; FUKUBAYASHI, T. New mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization. **Muscle & Nerve**, v.54, n.4, p.788-791, 2016.
- 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.
- WANG, Y.; PESSIN, J.E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.16, n.3, p.243-250, 2013.