

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA
CURSO DE BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

**PERDA DE SARCÔMEROS EM SÉRIE COM USO DE ELETROESTIMULAÇÃO
ARTIFICIAL EM MÚSCULOS DA PERNA DE COELHOS**

RAQUEL DE OLIVEIRA LUPION

PORTO ALEGRE

2012

RAQUEL DE OLIVEIRA LUPION

**PERDA DE SARCÔMEROS EM SÉRIE COM USO DE ELETROESTIMULAÇÃO
ARTIFICIAL EM MÚSCULOS DA PERNA DE COELHOS**

*Monografia apresentada à Escola de
Educação Física da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Educação Física.*

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Vaz

Co-orientador: Prof. Dr. Walter Herzog

PORTO ALEGRE

2012

Raquel de Oliveira Lupion

**PERDA DE SARCÔMEROS EM SÉRIE COM USO DE ELETROESTIMULAÇÃO
ARTIFICIAL EM MÚSCULOS DA PERNA DE COELHOS**

Conceito final:

Aprovado em.....de.....de.....

BANCA EXAMINADORA

Avaliador: Prof. Dr. Ronei Silveira Pinto

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Vaz - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Sozinha, jamais alcançaria nenhum sonho. Por isso, agradeço muito a todos que fizeram parte dessa história, em especial:

* À minha **família**, por todo apoio, suporte e paciência nesses longos anos de graduação. Ao **meu pai, Ricardo**, por ser minha fonte de inspiração e em quem eu me espelho, sempre. À **minha mãe, Rita**, a quem eu tenho profunda admiração por ser uma mulher completa, ótima mãe, companheira, esposa, profissional, amiga, que enfrenta todas as adversidades da vida de cabeça erguida e com sorriso no rosto. Ao **meu irmão, Rick**, que é prova viva de superação, força e vontade, e que me ensinou a nunca desistir e que a família nunca nos desaponta. E, finalmente, à **minha irmã, Renata**, quem eu admiro muito pela maturidade, força e pela persistência. Família: hoje sabemos o valor e a importância de sermos unidos, não conseguiria nada sem vocês. Vocês ganham e perdem junto comigo, e hoje a conquista é novamente NOSSA! Vamos sempre juntos, AMO VOCÊS!

* Ao **meu namorado, Cássio**, que apesar de não ter acompanhado toda a minha trajetória na Educação Física, sempre me apoiou e me ajudou a concretizar meus planos. Obrigada pela paciência, por entender minhas muitas horas de trabalho, pela dedicação, carinho e suporte. Vamos alçar grandes vôos juntos, meu amor! TE AMO!

* Aos **meus amigos**, os que trago de antes da graduação e os que fiz durante o curso, aqueles que não tenho mais contato, mas passaram e mudaram alguma parte da minha história, e aqueles que até hoje continuam construindo ela comigo. Amigos são a família que nós podemos escolher, e vocês são muito importantes para mim, muito obrigada pelo apoio, companhia, pelo ombro amigo, e pelos conselhos.

* Ao **Grupo de Pesquisa em Biomecânica e Cinesiologia (GPBiC) da UFRGS**, por me acolher há dois anos e me propiciar tanto aprendizado, muito crescimento pessoal e profissional, e amizades importantes, em especial ao **Jeam**

Geremia, que é mais do que orientador, mais do que amigo, é meu mentor desde o meu primeiro dia na 212 até hoje, e um dos grandes responsáveis por tudo o que aprendi e todas as oportunidades e conquistas que tive na pesquisa.

* Ao meu orientador e mestre, professor **Marco Aurélio Vaz**, que me recebeu no GPBiC, acreditou no meu potencial e no meu trabalho. Me ensinou muito, me orientou, e oportunizou uma das experiências mais relevantes da minha vida até hoje, de fazer intercâmbio na Universidade de Calgary, no Canadá, onde tive experiências maravilhosas, entre elas, o presente projeto de pesquisa.

* À equipe que trabalhei no Canadá, na Universidade de Calgary, no segundo semestre do ano de 2011, professor **Dr. Walter Herzog**, ao **Tim Leonard** e à **Maria Yamamoto**, por me darem a oportunidade de aprender muito e trabalhar nesse projeto, que resultou no meu Trabalho de Conclusão de Curso.

* Aos meus professores da graduação, aos funcionários da EsEF e a todos que, de qualquer maneira, ajudaram para que eu estivesse aqui hoje.

Por fim, uma das maiores lições que aprendi nos últimos anos:

“Devíamos ser ensinados a não esperar por inspiração para começar algo. Ação sempre gera inspiração. Inspiração raramente gera ação.”

Frank Tibolt

RESUMO

Introdução: A condição conhecida como espasticidade é caracterizada por um aumento na rigidez muscular, que está diretamente ligada à uma ativação elétrica anormal da musculatura. A criação de um modelo animal que a reproduza é difícil, pois ainda não se sabe ao certo os mecanismos que envolvem essa condição. Até hoje, apenas um estudo (Tabary e colaboradores, 1981) tentou reproduzir essa condição por meio de estimulação elétrica artificial crônica. Entretanto, para que novas propostas terapêuticas possam ser testadas, há a necessidade de se certificar de que o mecanismo descrito anteriormente por outros pesquisadores realmente é reproduzível. **Objetivo:** Reproduzir o protocolo proposto por Tabary e colaboradores em 1981, e verificar se o uso de eletroestimulação artificial diminui o número de sarcômeros em série da musculatura plantiflexora do tornozelo. **Materiais e Métodos:** A amostra foi composta por sete coelhos fêmeas da raça neozelandeza, divididos igualmente em dois grupos, um que sofreu eletroestimulação artificial em um dos membros (EEA=3) e o outro que sofreu apenas imobilização (IMO=4). Após esse protocolo de intervenção, os coelhos foram sacrificados e a musculatura plantiflexora do tornozelo foi extraída para análise. Foram analisados os músculos gastrocnêmio medial (GM), plantar (PLAN) e sóleo (SOL), e os parâmetros avaliados foram: o comprimento de fascículo (medido por um software de análise de imagem), o comprimento dos sarcômeros (medido por difração a laser) e o número de sarcômeros em série de cada musculatura (obtido pela divisão do valor do comprimento do fascículo pelo comprimento do sarcômero). **Resultados:** Houve diminuição do comprimento dos fascículos no grupo EEA em todos os músculos (GM 16,22% ± 18,25; PLAN 24,10% ± 13,85; SOL 15,23% ± 20,01), enquanto no grupo IMO, apenas o músculo GM não apresentou diminuição (-0,06% ± 7,44). Já quanto ao comprimento de sarcômeros, no grupo EEA houve aumento do comprimento em todos os músculos (GM 20,09% ± 6,91; PLAN 7,67% ± 4,59; SOL 23,25% ± 18,61), enquanto no grupo IMO apenas nos músculos GM e PLAN foi observado esse aumento (GM 3,27% ± 5,92; PLAN 6,57% ± 14,35; SOL -0,31% ± 2,53). O número de sarcômeros em série estava diminuído no grupo EEA (GM 22,87% ± 4,41; PLAN 25,49% ± 2,84; SOL 29,41% ± 6,97), enquanto no grupo IMO não houve diferença (GM 1,03% ± 8,61; PLAN -1,98% ± 7,60; SOL -1,81% ± 11,53). **Discussão:** A redução no número de sarcômeros em série com a estimulação elétrica demonstra que a adoção de uma posição encurtada do músculo decorrente de uma imobilização não é o fator responsável por essa adaptação estrutural. Com a ativação constante da musculatura, os sarcômeros permanecem muito encurtados e numa posição não eficiente para a produção de força, o que acarreta uma reorganização estrutural, com a eliminação de alguns sarcômeros para que outros possam se alongar e, assim, atingir o comprimento ideal para a produção de força. **Conclusão:** A estimulação elétrica crônica anormal dos músculos flexores plantares determinou adaptações estruturais semelhantes às da condição de espasticidade. O conhecimento dessas adaptações é útil no desenvolvimento de recursos terapêuticos que visem diminuir, ou até evitar, a perda de sarcômeros em série para propiciar uma melhora na qualidade de movimento e de vida dos pacientes portadores de espasticidade.

Palavras-chave: espasticidade, sarcômeros em série, eletroestimulação artificial

ABSTRACT

Introduction: The condition known as spasticity is characterized by an increase in muscle stiffness, which is directly linked to an abnormal electrical activation of the involved muscles. An animal model that reproduces this condition is difficult to be established because the mechanisms involved in this condition are not completely understood. To date, only one study (Tabary et al, 1981) tried to reproduce this condition. However, in order to test new therapeutic approaches with spastic patients, we need to test if the adaptation mechanism previously reported by these researchers is reproducible. **Purpose:** To reproduce the protocol proposed by Tabary and coworkers in 1981, and verify if the use of artificial electrical stimulation of the plantarflexor muscles decreases the number of sarcomeres in series. **Methods and Materials:** The sample consisted of seven Neozeland rabbits, divided equally into two groups, one that was subjected to artificial electrical stimulation of the hindlimbs (EEA=3) and the other that was subjected to limb immobilization (IMO=4). Following the protocols, the animals were euthanized and the plantarflexor muscles were extracted for analysis. The medial gastrocnemius (GM), plantaris (PLAN) and soleus (SOL) muscles were selected for analysis, and the obtained parameters were: fascicle length (measured by image analysis), sarcomere length (measured by laser diffraction) and the number of sarcomeres in series of each muscle (obtained by dividing the fascicle length by the sarcomere length). **Results:** There was a decrease in fascicle length in the EEA group for all plantarflexor muscles (GM 16.22% \pm 18.25; PLAN 24.10 \pm 13.85%, SOL 15.23% \pm 20.01), whereas in the IMO group the GM muscle fascicle length did not decrease (-0.06% \pm 7.44). For the sarcomere length, in the EEA group there was an increase in length for all muscles (GM 20.09% \pm 6.91% PLAN 7.67 \pm 4.59, SOL 23.25% \pm 18.61), while in the IMO group only GM and PLAN muscles presented this increase (GM 3.27 \pm 5.92%; PLAN 14.35 \pm 6.57%; SOL 0.31% \pm 2.53). The number of sarcomeres in series decreased in the EEA group (GM 22.87% \pm 4.41; PLAN 25.49% \pm 2.84, SOL 29.41% \pm 6.97), whereas in the IMO group there was no change (GM 1.03 \pm 8.61%; PLAN 1.98% \pm 7.60; SOL 1.81% \pm 11.53). **Discussion:** The reduction of serial sarcomeres with the electrical stimulation demonstrates that the adoption of a muscle shortened position due to immobilization is not the factor responsible for this structural adaptation. While under electrical activation, the sarcomeres were in a very shortened position, which was not efficient for force production. Because of that, there was a structural reorganization with elimination of some sarcomeres so that others could be stretched and thus reach the ideal length for force production. **Conclusion:** Chronic abnormal artificial electrical stimulation of the plantarflexor muscles determined structural adaptations similar to those of spasticity. Knowledge of these structural adaptations is important for the determination of the mechanisms of adaptations due to spasticity, and may allow for the development of therapeutic approaches aimed at reducing, or even preventing, the loss of sarcomeres in series, improving quality of movement and quality of life of spastic patients.

Key-words: spasticity, sarcomeres in series, electrical stimulation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10 -
2 REVISÃO DE LITERATURA	14 -
2.1 Morfologia muscular	14 -
2.2 Mecânica e eletrofisiologia da contração muscular	15 -
2.3 Relação força-comprimento do sarcômero	17 -
2.4 Adaptações do tecido muscular ao desuso e à eletroestimulação	18 -
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22 -
3.1 Amostra.....	22 -
3.2 Procedimentos éticos	22 -
3.3 Protocolos de intervenção.....	22 -
3.4 Dissecção dos músculos.....	25 -
3.5 Preparação das lâminas de microscópio	29 -
3.6 Protocolo da análise de dados	30 -
3.7. Análise dos dados.....	32 -
4 RESULTADOS	33 -
5 DISCUSSÃO	36 -
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40 -
7 REFERÊNCIAS.....	41 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura ilustrativa da relação força-comprimento do sarcômero. (<i>Adaptado de NIGG e HERZOG, 2006</i>).....	- 18 -
Figura 2. Esquema ilustrativo da adaptação dos sarcômeros em série à posição encurtada. a) Representação dos sarcômeros em um comprimento ótimo de produção de força. b) Representação dos miofilamentos em sobreposição, dificultando a produção de força. c) Representação dos sarcômeros em superalongamento.....	- 20 -
Figura 3. Imobilização do membro posterior.	- 24 -
Figura 4. Procedimentos de manutenção da temperatura corporal e sedação dos coelhos.....	- 25 -
Figura 5. Fixação dos membros e submersão em formol em pote plástico.	- 26 -
Figura 6. Dissecção do músculo (gastrocnêmio medial).	- 28 -
Figura 7. Músculo seccionado submerso em PBS.	- 28 -
Figura 8. Armazenamento das lâminas de microscópio.....	- 30 -
Figura 9. Difração a laser. Observe as duas colunas de luz posicionadas lateralmente ao feixe de laser incidindo no centro da lâmina.....	- 31 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Músculos e porções seccionadas.....	- 27 -
Tabela 2. Exemplo da identificação das lâminas de microscópio.....	- 30 -
Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) do valor percentual da diminuição do comprimento de fascículo da perna experimental em relação à perna controle...	- 34 -
Tabela 4. Média e desvio padrão do valor percentual do aumento do comprimento dos sarcômeros da perna experimental em relação à perna controle.....	- 34 -
Tabela 5. Média e desvio padrão do percentual de perda de sarcômeros em série da perna experimental em relação à perna controle.	- 35 -

1 INTRODUÇÃO

Paralisia cerebral é um termo que descreve um grupo de condições motoras não progressivas, que causam incapacidades físicas no desenvolvimento motor, e é causada por danos nos centros de controle motor no cérebro em desenvolvimento, que frequentemente ocorrem durante a gestação ou no nascimento (BAX e col., 2005). O comprometimento do sistema nervoso central pode ser ocasionado por fatores endógenos e exógenos. Como principal fator endógeno pode-se citar a susceptibilidade genética do cérebro à lesão. Os fatores exógenos distinguem-se pelo momento do desenvolvimento em que ocorrem, sendo classificados em pré-natal (infecções, intoxicações, radiações), peri-natal (hipoxemia associada à isquemia) e pós-natal (anóxia) (MORRIS, 2007; ROTTA, 2002).

Uma forma de classificação dos tipos de paralisia cerebral é baseada nas alterações clínicas do tônus muscular e no tipo de desordem do movimento, podendo gerar o tipo espástico, discinético, atáxico, hipotônico ou misto (MORRIS, 2007). A paralisia cerebral espástica (PCE) é a forma mais comum de paralisia cerebral, sendo encontrada em cerca de 88% dos casos de paralisia cerebral (LEITE e PRADO, 2004), e está associada com a hipertonicidade muscular e com o reflexo de estiramento aumentado. A espasticidade ocorre devido a lesões no neurônio motor superior e tem um grande impacto na vida do paciente, pois tem como consequências a fraqueza muscular, a fadiga e a falta de destreza na realização dos movimentos finos (NUNES, 2004).

Não existem dados oficiais e atuais sobre a incidência da paralisia cerebral no Brasil, mas estima-se que os índices alcancem 7:1000 nascidos vivos em países subdesenvolvidos, cerca de 30.000 a 40.000 novos casos por ano (MANCINI e col., 2002).

Além das deficiências neuromotoras, a espasticidade pode resultar em outras limitações na vida do paciente acometido, como o desempenho de atividades do cotidiano do paciente e da sua família. Atividades básicas como escovar os dentes, colocar a roupa, amarrar os sapatos, levantar da cama, alimentar-se sozinho ou brincar com brinquedos pode ser impraticável para uma criança portadora de PCE, e

a dificuldade no desempenho dessas atividades constitui a queixa principal dos pais e familiares desses indivíduos (MANCINI e col., 2002).

As intervenções terapêuticas nesses pacientes se tornam de extrema importância e muito necessárias para o bem do paciente e para uma melhora da sua qualidade de vida. Entretanto, as intervenções fisioterapêuticas mecânicas que serviriam para diminuir o tônus muscular e aumentar a mobilidade articular dos pacientes parecem não funcionar em indivíduos com PCE. Em 1990, a Seção Pediátrica da Associação Americana de Terapia Física declarou que não havia evidência alguma de que a terapia física diminuiria o tônus muscular ou os reflexos primitivos das pessoas acometidas pela PCE (LEITE e PRADO, 2004).

Indivíduos portadores de paralisia cerebral têm aumento da rigidez muscular, clinicamente conhecida como espasticidade, que está diretamente ligada ao comprimento da fibra muscular, e não à quantidade de tecido fibroso depositado na musculatura (O'DWYER e col., 1989). Existem evidências de que os músculos espásticos possuem um número significativamente diminuído de sarcômeros em série. Assim, além do menor comprimento das fibras, os músculos espásticos têm os sarcômeros (super-) alongados (TABARY e col., 1981; O'DWYER e col., 1989). Portanto, a força ativa dessas fibras é diminuída devido a menor sobreposição dos filamentos de actina e miosina, e a força passiva é aumentada devido ao estiramento dos sarcômeros (O'DWYER e col., 1989). Uma das hipóteses que podem explicar essas alterações biomecânicas nos músculos de pacientes com paralisia cerebral é a ativação elétrica de duração anormal dos músculos (TABARY e col., 1981).

Para tentar entender o que ocorre com a arquitetura muscular de pacientes acometidos pela espasticidade, alguns autores vêm estudando, em modelos animais (TABARY e col., 1981; BAX e col., 1985; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; WILLIAMS e col., 1988; BAKER e MATSUMOTO, 1988), a interferência da eletroestimulação de baixa intensidade e da imobilização em posição encurtada no número de sarcômeros em série, para que, uma vez elucidados os mecanismos intrínsecos dessa condição, seja possível adequar os tratamentos clínicos terapêuticos para essa população.

É de grande importância que estudos que investiguem a plasticidade muscular da espasticidade continuem sendo desenvolvidos para uma maior compreensão do que ocorre ao nível celular em uma musculatura que foi estimulada anormalmente, de modo a dar início à elucidação dos mecanismos por trás dos efeitos deletérios da espasticidade e também possibilitar o planejamento de ações para diminuir os efeitos dessa condição.

Esse trabalho foi a primeira parte de um grande projeto que tem como objetivo testar diferentes abordagens terapêuticas na prevenção e tratamento da perda dos sarcômeros em série ocasionada por estimulação anormal da musculatura esquelética. Relativo aos processos de plasticidade neuromuscular, não foram encontrados muitos estudos (TABARY e col., 1981; BAX e col., 1985; WILLIAMS e col., 1988) e todos são muito antigos. Em função disso, viu-se a necessidade de reproduzir o estudo de TABARY e colaboradores (1981), que foi o único a testar se a eletroestimulação artificial de baixa intensidade afetaria o número de sarcômeros em série, na tentativa de reproduzir artificialmente uma condição de ativação constante semelhante àquela encontrada em indivíduos espásticos. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo verificar se a eletroestimulação artificial de baixa intensidade, aplicada de forma contínua, reduz o número de sarcômeros em série da musculatura plantiflexora de coelhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia muscular

A musculatura esquelética é um sistema altamente organizado e bem estruturado, que tem como principal função a contração para produção de movimento (MOORE e DALLEY, 2007). Em um corte transversal, a hierarquia da estrutura muscular consiste em:

- Fibra muscular: célula muscular recoberta pelo endomísio.
- Fascículo muscular: conjunto de fibras musculares recoberto pelo perimísio.
- Músculo: conjunto de fascículos musculares recoberto pelo epimísio.

A fibra muscular é a célula do sistema muscular, e é constituída de plasma, chamado de sarcoplasma, e de estruturas celulares específicas, como as células satélites, que estão localizadas entre o sarcoplasma e a membrana celular. A célula muscular tem vários núcleos, localizados em sua periferia, ao longo de seu comprimento. Na sua estrutura interna, uma fibra muscular contém subunidades específicas menores, como as miofibrilas, os túbulos T e o retículo sarcoplasmático (WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010).

Os túbulos T são extensões da membrana celular e atravessam toda a fibra muscular entre as miofibrilas, permitindo que os impulsos nervosos recebidos sejam transmitidos rapidamente a cada miofibrila. O retículo sarcoplasmático compõe uma rede longitudinal de túbulos, que se enrola nas miofibrilas, e armazena cálcio, substância essencial para a contração muscular (WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010).

A miofibrila é o elemento contrátil do músculo esquelético, e é formada pelos sarcômeros, que são conhecidos como a unidade funcional do músculo (WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010). Eles estão arranjados em sequência um ao outro e é isso que dá o padrão estriado da musculatura, quando observado num microscópio óptico (NIGG e HERZOG, 2006; WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010). O sarcômero é delimitado por duas linhas Z nas extremidades e contém filamentos finos (actina) e filamentos grossos (miosina), entre outras estruturas. Os

filamentos grossos se encontram no centro do sarcômero e os filamentos finos se encontram em cada lado da linha Z. A miosina é uma estrutura composta por uma cauda e duas cabeças globulares que contém um sítio de ligação para a actina e um de catalisação de ATP. Já a actina é composta de duas cadeias de glóbulos de actina dispostos em série e enrolados em si mesmo, num padrão helicoidal. O filamento fino também possui glóbulos de troponina e filamentos de tropomiosina (NIGG e HERZOG, 2006; WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010).

O sarcômero também possui outra proteína, a titina, que se dispõe da linha Z até o centro do sarcômero, passando por dentro do filamento grosso de miosina. Embora a função exata da titina continue um mistério, é consenso que ela funcione como uma mola, que produz tensão quando o sarcômero é alongado, e, por sua localização, especula-se que ela estabilize a miosina no centro do sarcômero. Na sua estruturação, o sarcômero possui duas bandas, a A (anisotrópica = banda escura) que é composta por filamento fino, grosso e titina, e a I (isotrópica = banda clara) que é composta por filamento fino e titina, além da linha M que divide o sarcômero exatamente no meio, e da zona H que é a região dentro da banda A onde só existe filamento grosso e titina (NIGG e HERZOG, 2006; WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010).

2.2 Mecânica e eletrofisiologia da contração muscular

Enquanto o sarcômero é a unidade funcional de um músculo (WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010), a unidade funcional do sistema neuromuscular é a unidade motora, que consiste em um motoneurônio e as fibras por ele inervadas (NIGG e HERZOG, 2006). Uma unidade motora grande é constituída por um motoneurônio que inerva milhares de fibras musculares, como nos grandes músculos da coxa ou costas, e é basicamente composta de fibras do tipo rápida. Já uma unidade motora pequena é aquela em que um motoneurônio inerva algumas poucas fibras musculares, como nos músculos das mãos, que requerem movimentos finos e precisos, e são predominantemente composta por fibras do tipo lenta (NIGG e HERZOG, 2006; WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010).

Quando um motoneurônio é estimulado suficientemente, todas as fibras que ele inerva são ativadas, e há a contração. Como a produção de força, entre outros fatores, é proporcional à quantidade de fibras musculares envolvidas na contração, a ativação de uma unidade motora grande produz maior força de contração (NIGG e HERZOG, 2006). Para que a contração ocorra, é necessário um evento especial proveniente do cérebro ou da medula espinhal, que é chamado de potencial de ação.

O potencial de ação é um estímulo eletroquímico, transmitido através de impulsos elétricos através dos neurônios, que atinge o motoneurônio α e sinaliza a liberação de neurotransmissores (acetilcolina) na junção neuromuscular. A junção neuromuscular é formada pelo terminal axônico do motoneurônio α (terminal pré-sináptico) e a placa motora, ou seja, as miofibrilas que aquele neurônio inerva. Quando o potencial de ação chega ao terminal pré-sináptico, uma série de reações químicas ocorre, e culmina na liberação de acetilcolina na fenda sináptica. Essa acetilcolina se liga a receptores na placa motora e aumenta a permeabilidade do sarcolema ao sódio, e esse sódio começa a entrar na célula. Quando alcança um limite de concentração (ou limiar de excitabilidade) ocorre a despolarização do sarcolema e o potencial de ação é propagado ao longo daquela fibra muscular (NIGG e HERZOG, 2006).

Uma vez propagado, o potencial de ação alcança os túbulos T, que são invaginações da membrana plasmática para o interior da fibra muscular. A despolarização desses túbulos causa a liberação de cálcio dos retículos sarcoplasmáticos no interior do citoplasma, e esse cálcio se liga à troponina localizada no filamento fino, removendo o mecanismo inibitório da ligação da ponte-cruzada, isto é, libera o sítio de ligação da actina para interação com a miosina. Então, a miosina se liga à actina formando a ponte-cruzada, e uma molécula de adenosina trifosfato é hidrolisada para liberar a energia necessária para que haja a tração do filamento fino sobre o filamento grosso, e o consequente encurtamento do sarcômero (NIGG e HERZOG, 2006; WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010). Ao final do movimento da ponte-cruzada, outra molécula de adenosina trifosfato deve ser conectada à proteína ATPase na cabeça de miosina para que haja o desligamento da miosina na actina, e a primeira possa retornar a posição inicial e estar pronta para uma nova ligação.

A contração terá continuidade enquanto existir cálcio livre no sarcoplasma. Assim que não houver mais potencial de ação sendo propagado, o cálcio retorna ao retículo sarcoplasmático pelas bombas de cálcio localizadas na membrana do retículo e o mecanismo de inibição da troponina fica ativado (WILLMORE, COSTILL e KENNEY, 2010).

2.3 Relação força-comprimento do sarcômero

Como descrito acima, a produção de força depende diretamente do número de pontes cruzadas produzidas. Assume-se que cada ponte cruzada produza a mesma quantidade de força, e que elas estão arranjadas equidistantes umas das outras ao longo do sarcômero. Por isso, a sobreposição do filamento fino sobre o filamento grosso determina o número de ligações possíveis, determinando a quantidade de força a ser produzida.

A relação força-comprimento descreve a relação que existe entre a força máxima que um músculo consegue produzir de acordo com seu comprimento (NIGG e HERZOG, 2006). Ela é obtida por contrações isométricas e máxima ativação da estrutura, que pode ser músculo, fibra ou sarcômero. No máximo comprimento do sarcômero, os filamentos fino e grosso não se sobrepõem em nenhum ponto, e as pontes cruzadas não são formadas (letra “e” na Figura 1); portanto, a força produzida deve ser zero. À medida que o sarcômero vai encurtando, aumenta o número de pontes cruzadas que podem ser formadas, por conta da sobreposição gradual dos filamentos, até que essa sobreposição alcance um número máximo de ligações actina-miosina (letra “d” na Figura 1). Essa condição é conhecida como o comprimento ótimo para a produção de força, pois todas as pontes cruzadas possíveis estão formadas.

A partir daí, à medida que o sarcômero continua encurtando, os filamentos continuam se sobrepondo, porém não há mais pontes cruzadas a serem formadas (letra “c” na Figura 1). Até que chega um ponto quando os filamentos finos começam a se sobrepor entre eles mesmos, e o número de pontes cruzadas começa a diminuir, e, conseqüentemente, a produção de força também decai (letra “b” na

Figura 1). Por fim, o sarcômero tão encurtado já exibe os filamentos grossos deformados e não há nenhuma ponte cruzada formada (letra “a” na Figura 1), ou seja, a força é zero (NIGG e HERZOG, 2006).

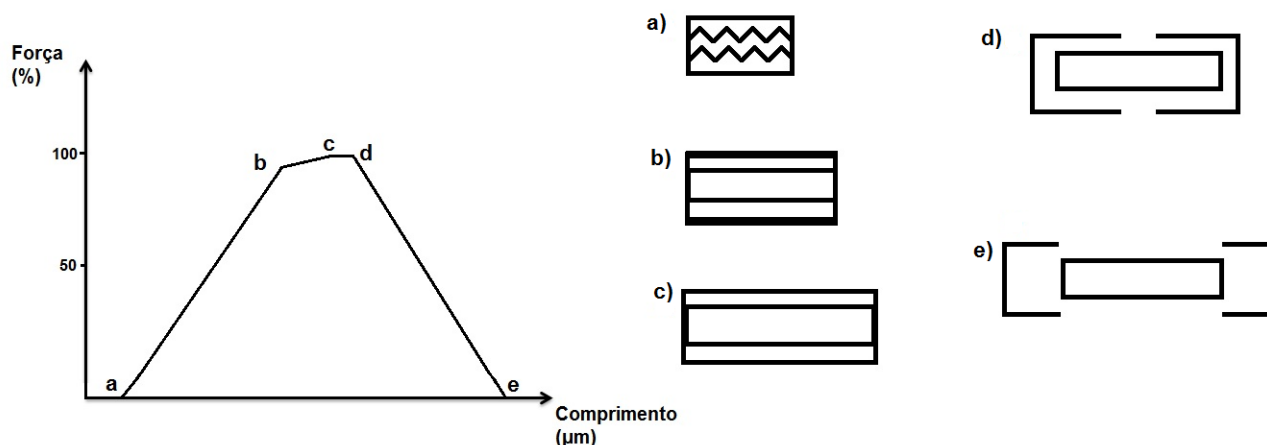


Figura 1. Figura ilustrativa da relação força-comprimento do sarcômero. (**Adaptado de NIGG e HERZOG, 2006**).

Existem diferenças nos comprimentos dos miofilamentos entre as diferentes espécies e até mesmo entre os animais de uma mesma espécie. Durante a evolução, o sistema muscular foi sendo otimizado para satisfazer as diferentes e novas demandas impostas a ele. Por isso, diferentes estruturas são características de diferentes espécies (NIGG e HERZOG, 2006). No ser humano, a produção de força pode ser maior em diferentes comprimentos de acordo com as diferentes demandas (FRASSON e col. 2007). Em outras palavras, a adaptação do sistema muscular ocorre não apenas em função do processo evolutivo, mas também em face às demandas funcionais a que o sistema muscular é submetido de forma aguda e crônica.

2.4 Adaptações do tecido muscular ao desuso e à eletroestimulação

O tecido muscular é um sistema altamente capaz de se adaptar a demandas ambientais externas as quais ele é submetido (NIGG e HERZOG, 2006). Assim como ele hipertrofia frente a demandas de exercício, ele também hipotrofia com a redução do uso, imobilização ou envelhecimento. Várias são as consequências

dessas adaptações, mas sabe-se que na redução do uso da musculatura há uma diminuição da produção de força associada a um aumento na degradação das proteínas musculares, que causa uma rápida atrofia, e essa está diretamente associada com as atividades antes da redução do uso.

Na imobilização, há uma interrupção inesperada na produção de movimento, que é a principal função do sistema muscular. Uma vez desprovido de atividade, o músculo começa a perder componentes que não estão mais sendo utilizados, para evitar o gasto energético desnecessário. Já foi encontrada uma diminuição de cerca de 20% no número de sarcômeros em série com apenas uma ou duas semanas de imobilização com o músculo em uma posição encurtada (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973; HESLINGA, KRONNIE e HUIJING, 1995; LIMA e col., 2007).

Estudos realizados em animais demonstraram que o músculo imobilizado em posição encurtada diminui o número de sarcômeros em série, e o músculo mantido em posição alongada adiciona sarcômeros (TABARY e col., 1972; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; PONTÉN e FRIDÉN, 2008). Alguns autores sugerem que essas adaptações no número de sarcômeros ocorrem no sentido de preservar uma sobreposição adequada entre os filamentos finos e grossos (TABARY e col., 1972; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; TARDIEU e col., 1982; WILLIAMS e col., 1988). Os sarcômeros têm um comprimento ótimo de produção de força (letra “a” da Figura 2), e, quando são encurtados, os miofilamentos sobrepõem-se de forma a dificultar a produção de força (letra “b” da Figura 2). Quando permanecem nessa condição por muito tempo, alguns sarcômeros em série são eliminados para dar espaço aos remanescentes para se alongarem e tentarem retornar à posição ótima de produção de força. Entretanto, geralmente nesse processo ocorre um super-alongamento dos sarcômeros, deixando-os maiores do que eram originalmente e, por vezes, diminuindo a produção máxima de força (letra “c” da Figura 2) (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; O'DWYER e col., 1989).

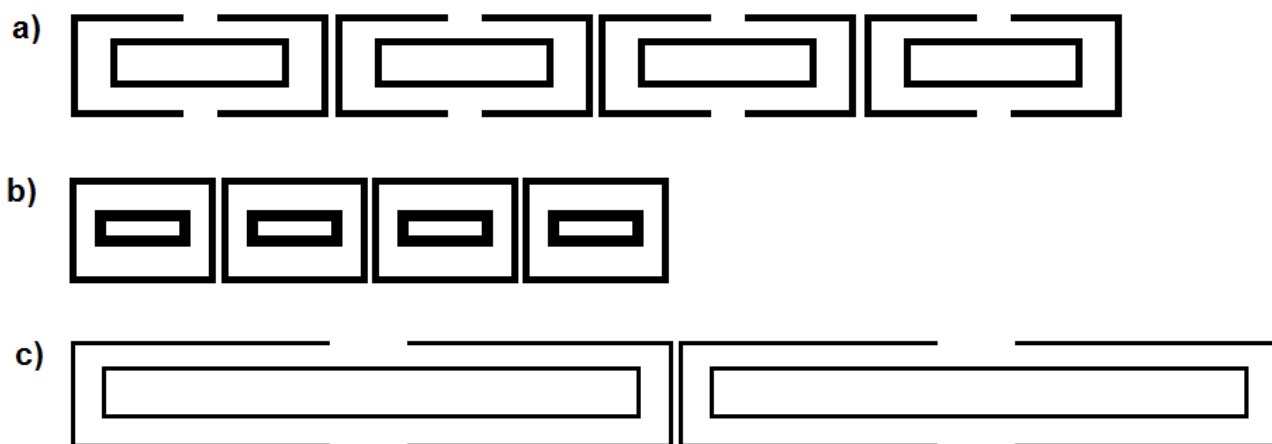


Figura 2. Esquema ilustrativo da adaptação dos sarcômeros em série à posição encurtada. a) Representação dos sarcômeros em um comprimento ótimo de produção de força. b) Representação dos miofilamentos em sobreposição, dificultando a produção de força. c) Representação dos sarcômeros em superalongamento.

Pesquisas que investigaram a imobilização muscular em posições específicas também encontraram que a curva força-comprimento dos músculos sofre alterações após o período de intervenção (TABARY e col., 1972; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; TARDIEU e col., 1982). Assim, a imobilização em posição alongada desloca a curva força-comprimento do músculo para a direita (a força máxima é produzida em um comprimento muscular maior) (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; TARDIEU e col., 1982), enquanto que a imobilização com o músculo encurtado promove o deslocamento dessa curva para a esquerda (a força máxima é produzida em um comprimento muscular menor) (TABARY e col., 1972; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; TARDIEU e col., 1982), modificando o seu comprimento ótimo para gerar força.

As adaptações do tecido muscular à eletroestimulação são muito semelhantes às adaptações ao desuso (JAKUBIEC-PUKA e col., 1988). Entretanto, ocorrem em uma velocidade muito maior, em apenas 12h de eletroestimulação já é possível verificar diminuição significativas do número de sarcômeros em série (TABARY e col., 1981; JAKUBIEC-PUKA e col., 1988).

Nesses estudos, foram encontrados como adaptações da musculatura variados comprimentos de fibras, tanto no mesmo músculo, quanto em músculos

adjacentes, e também uma desorganização da estrutura miofibrilar, como irregularidades nas linhas Z e bandas A e I indistinguíveis (JACUBIEK-PUKA e col. 1988).

Essa rápida adaptação da musculatura à eletroestimulação pode ser atribuída ao fato do músculo estar sendo contraído, e não apenas em uma posição encurtada (TABARY e col., 1981).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta de dados foi feita em duas etapas. A primeira etapa consistiu na estimulação elétrica artificial (EEA) e a segunda etapa na imobilização (IMO) dos membros inferiores de coelhos.

3.1 Amostra

Para a primeira etapa foram utilizados três e para a segunda etapa quatro coelhos neozelandeses fêmeas, de idade aproximada de sete meses e massa corporal média de cinco quilos. O número de animais utilizados na amostra foi definido a partir dos valores médios de estudos prévios (TABARY e col., 1972; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; TARDIEU e col., 1982; WILLIAMS e col., 1988). A amostra foi separada em dois grupos: o grupo que recebeu eletroestimulação artificial (EEA) e o grupo que foi submetido a imobilização (IMO), que serviu de controle.

3.2 Procedimentos éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética das Ciências da Vida e do Ambiente da Universidade de Calgary (Calgary, Alberta, Canadá). Todos os animais foram acomodados em concordância com as diretrizes estabelecida pelo Conselho Canadense de Cuidados com Animais (Universidade de Calgary, Calgary, Alberta, Canadá) e tiveram acesso irrestrito à água e comida.

3.3 Protocolos de intervenção

Em ambas as etapas, apenas uma das pernas sofreu intervenção. A escolha de qual seria a perna experimental foi feita aleatoriamente por sorteio, e a perna contralateral foi usada como controle da perna experimental.

Primeira etapa – eletroestimulação artificial

Os animais foram sedados antes da cirurgia com maleato de acepromazina (Ayerst Labs, Montreal, Canadá) na dosagem de 1.0 mg/Kg de peso por via subcutânea. Após trinta minutos de espera para a droga fazer efeito, os animais foram anestesiados com anestésico inalatório isoflurano (Benson Medical, Markham, Ontario, Canadá) combinado com oxigênio numa concentração de 5% de anestésico para a indução, e de 2 a 3% para a manutenção da sedação durante os procedimentos cirúrgicos do protocolo.

O pelo que recobria a lateral externa de ambos os membros traseiros, do quadril ao tornozelo, foi removido com o auxílio de uma tesoura. Os coelhos foram colocados numa mesa cirúrgica aquecida para a cirurgia. Uma incisão foi feita na lateral da perna, onde o nervo ciático se subdivide nos nervos tibial e fibular comum. Na perna experimental, o nervo tibial foi gentilmente isolado do tecido conectivo circundante para que fosse possível a colocação de um eletrodo ao redor do nervo (HERZOG e col., 1992). O eletrodo foi fixado através de suturas para prevenir possíveis deslocamentos. No membro contralateral, o nervo tibial foi isolado do nervo fibular comum e seccionado, para prevenir qualquer estimulação cruzada nos músculos desse membro. Ambas as incisões foram fechadas utilizando-se grampos de sutura (Fine Science Tools Inc., Vancouver, Canadá).

A fiação externa dos eletrodos foram conectadas a um estimulador elétrico (Grass S8800, Astro-Med, Brossard, Quebec, Canadá), que foi programado para gerar pulsos de 0.1 ms numa frequência de 20 Hz. A estimulação foi contínua e a intensidade do estímulo foi calculada para ser três vezes superior ao limiar excitatório do nervo tibial. Ao início da estimulação, o tornozelo dos coelhos tornava-se bastante plantifletido e nenhuma interferência na angulação da articulação foi feita, e a medida do ângulo de plantiflexão foi medido após dez minutos do início da estimulação. Após 10 horas de estimulação, os coelhos foram eutanasiados através

de injeção subcutânea de 3 mL de pentobarbital sódico numa concentração de 240 mg/mL na veia lateral da orelha do animal.

Segunda etapa – imobilização passiva

Os animais foram anestesiados com anestésico inalatório isoflurano (Benson Medical, Markham, Ontario, Canadá) combinado com oxigênio numa concentração de 5% de anestésico para a indução, e de 2 a 3% para a manutenção da sedação durante o protocolo. Após a sedação, um dos membros era aleatoriamente imobilizado, e a imobilização era feita em máxima plantiflexão passiva através de um bastão de madeira, que foi fixado na altura do quadril até o pé por meio de fita adesiva (Figura 3), enquanto o outro membro foi deixado livre. A frequência respiratória, a temperatura corporal e a umidade e cor das mucosas foram constantemente verificadas. O protocolo foi constituído de um total dez horas de imobilização.



Figura 3. Imobilização do membro posterior.

Durante todo o protocolo, os coelhos foram mantidos em decúbito lateral sobre uma almofada térmica. Lenços absorventes foram utilizados por baixo e por cima de seus corpos, para auxiliar na manutenção da temperatura, assim como luzes infravermelhas posicionadas diretamente acima dos animais (Figura 4). A hidratação corporal foi garantida através de duas injeções de 20cc de solução salina (5% de dextrose) sub-cutânea, uma administrada no início do protocolo e a outra na segunda metade do protocolo.

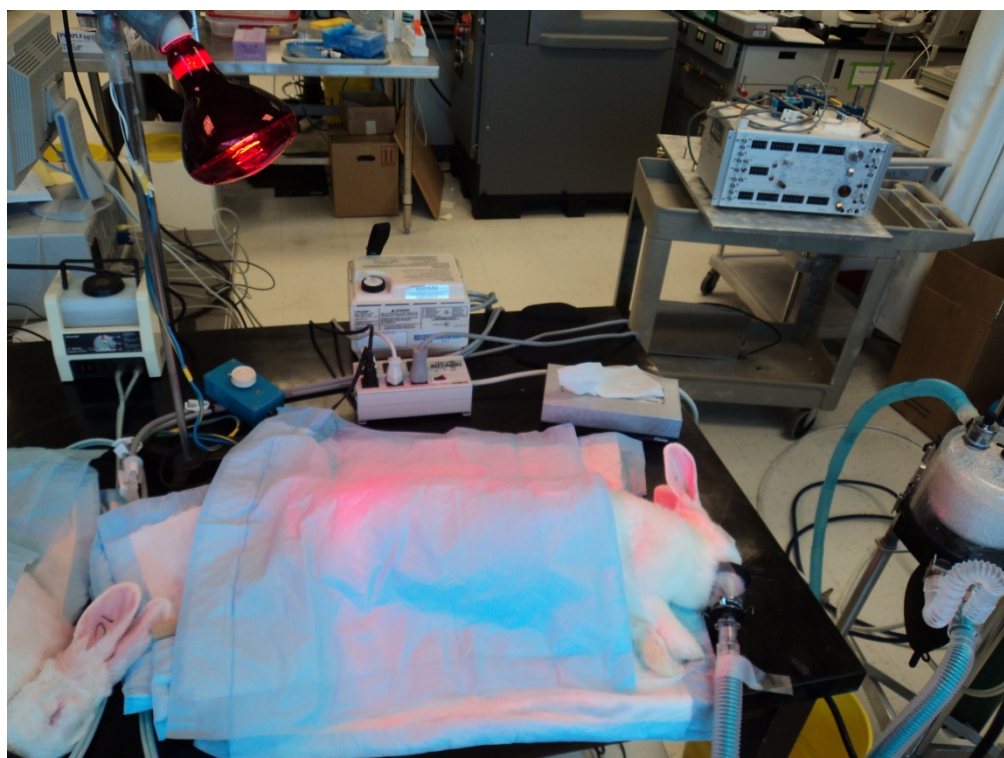


Figura 4. Procedimentos de manutenção da temperatura corporal e sedação dos coelhos.

Após os diferentes protocolos de intervenção, os coelhos seguiram as mesmas fases de processamento (dissecção e preparação das amostras) e análise de dados.

3.4 Dissecção dos músculos

Após a retirada de toda a pele e possíveis depósitos de gordura do quadril ao pé, os membros foram extraídos na altura do quadril e todos os músculos que não faziam parte do tríceps sural foram descartados, assim como o antepé, que foi serrado e também descartado. Os membros foram fixados em um pote plástico *Tupperware*[®], por meio de alfinetes, em uma camada de silicone, em ângulos semelhantes nos dois membros (Figura 5). Os membros, então, foram submersos em uma solução contendo 10% de formol, na qual permaneceram por, pelo menos, duas semanas.



Figura 5. Fixação dos membros e submersão em formol em pote plástico.

Após isso, todos os músculos do tríceps sural foram desarticulados dos membros, medidos em seu comprimento através de um paquímetro e fotografados com uma legenda contendo o nome do músculo e qual o lado de origem (Figura 6). Amostras das diferentes porções dos músculos foram retiradas (de acordo com a Tabela 1), colocadas em placas de petry e submergidas em solução tampão fosfato-salino (PBS) (Figura 7). Essa solução é uma solução salina contendo cloreto de sódio e fosfato de sódio, e auxilia na manutenção de um pH constante. A concentração geralmente é igual a do corpo humano (isotônico).

Tabela 1. Músculos e porções seccionadas.

Músculo	Porções do músculo
Gastrocnêmio Medial	<ul style="list-style-type: none">- anterior- centro #1- centro #2- posterior
Plantar	<ul style="list-style-type: none">- posterior proximal- posterior distal- centro proximal- centro distal- anterior proximal- anterior distal
Sóleo	<ul style="list-style-type: none">- posterior proximal- posterior distal- centro proximal- centro distal- anterior proximal- anterior distal

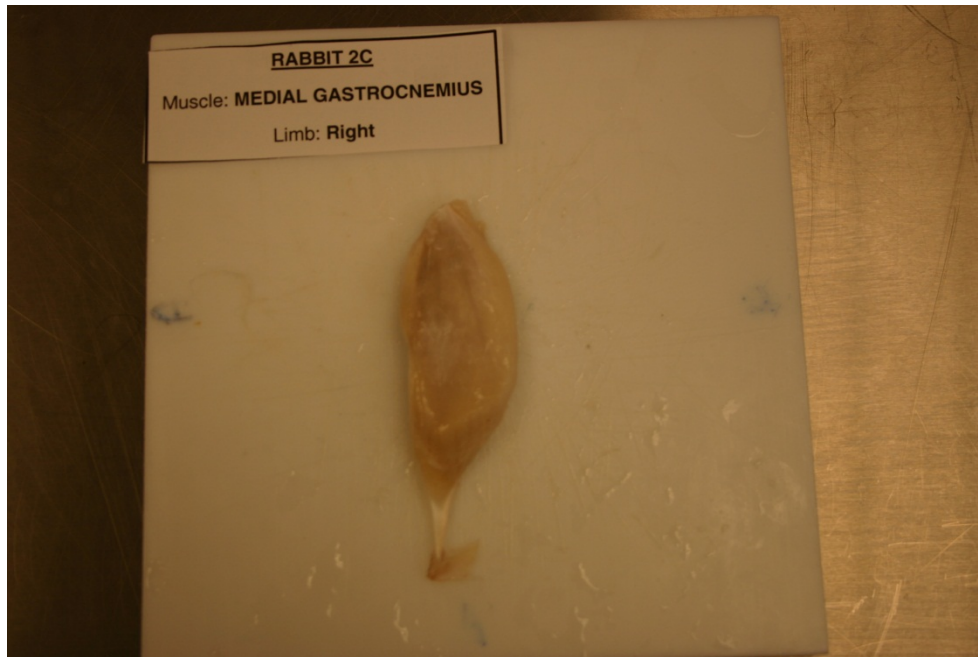


Figura 6. Dissecção do músculo (gastrocnêmio medial).



Figura 7. Músculo seccionado submerso em PBS.

3.5 Preparação das lâminas de microscópio

Após 24-48 horas no PBS, as amostras foram transferidas para novas placas de petri, agora contendo uma solução de 30% de ácido nítrico, para que todo o tecido conjuntivo presente na amostra fosse eliminado, e restasse apenas tecido muscular. As amostras permaneceram no ácido nítrico por pelo menos 50 horas. Algumas porções musculares continham mais tecido conjuntivo que outras (por exemplo, o músculo sóleo), necessitando permanecer no ácido nítrico por mais tempo.

Passado o tempo necessário de digestão do tecido conectivo, as amostras foram transferidas para novas placas de petri e submersas em glicerol. Após essa etapa, as amostras poderiam permanecer nessas condições por tempo indeterminado. Após estarem no glicerol, as amostras estavam prontas para a preparação das lâminas. Foram montadas cinco lâminas de cada porção de cada músculo, totalizando 95 lâminas de microscópio (19 porções dos músculos x 5 lâminas de cada), contendo um (ou mais) fascículos musculares.

Para a montagem das lâminas, a placa de petri contendo glicerol foi colocada no microscópio, de modo a possibilitar a visualização dos fascículos. Com o auxílio de duas pequenas varetas de madeira, um fascículo era separado do resto da porção muscular e colocado sobre a lâmina de microscópio contendo uma leve camada de glicerol. O fascículo deveria ser obtido inteiro (não poderia estar quebrado), e isso era assegurado através da observação cuidadosa do ponto de origem e de inserção dos fascículos. Uma vez identificado o melhor fascículo, esse foi posicionado da maneira mais estendida possível por cima da lâmina, e, em seguida, a lamela era posicionada de maneira a não criar bolhas entre a lâmina e ela. As lâminas foram guardadas em caixas adequadas, devidamente identificadas (Tabela 2) e levemente inclinadas, para que as lamelas não deslizassem no glicerol (Figura 8).

Tabela 2. Exemplo da identificação das lâminas de microscópio.

R1C - 1	R1C - 2	R1C - 3	R1C - 4	R1C - 5
GM	GM	GM	GM	GM
D - Post	D - Post	D - Post	D - Post	D - Post

* O número (do 1 ao 5) ao lado da identificação do coelho se refere ao número da lâmina; R1C: identificação do coelho; GM: músculo (gastrocnêmio medial); D: identificação do membro (direito ou esquerdo); Post: identificação da porção do músculo (posterior).



Figura 8. Armazenamento das lâminas de microscópio.

3.6 Protocolo da análise de dados

A análise do comprimento do fascículo foi feita através de uma câmera (WAT-902H2-Supreme) que captava a imagem do fascículo na lâmina de microscópio e enviava essa imagem para o software Matrox Inspector 4.0, no qual era mensurado o comprimento. No software, era possível trabalhar com as cores da imagem, de modo a isolar a imagem do fascículo e, através de uma ferramenta de desenho “polígono”, sobrepôr uma linha em todo o comprimento dele, de modo a identificar qual era o seu tamanho. A calibração das imagens foi realizada nesse software, para

que o valor medido no comprimento do fascículo correspondesse à uma medida real, feita com régua.

A análise do comprimento dos sarcômeros foi feita por difração a laser, colocando a lâmina no suporte do difrator e posicionando o fascículo no feixe do laser. Assim que o fascículo estava centralizado no feixe do laser apareciam duas colunas de difração (Figura 9).

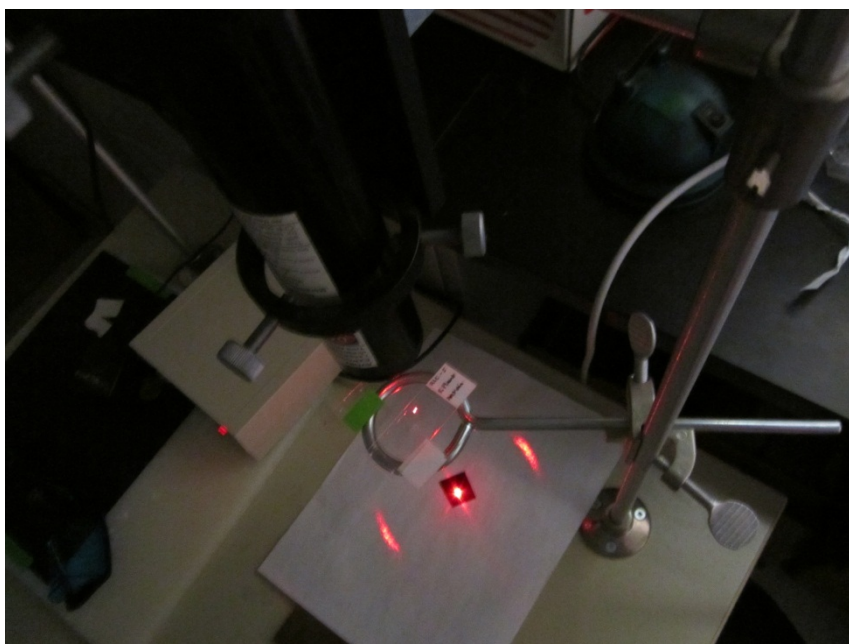


Figura 9. Difração a laser. Observe as duas colunas de luz posicionadas lateralmente ao feixe de laser incidindo no centro da lâmina.

Foi mensurada, então, a distância de uma dessas colunas de difração até o centro do feixe do laser, e esse valor foi colocado numa fórmula que prediz a média do comprimento dos sarcômeros existentes na área abrangida pelo laser (Equação 1). A lâmina foi sendo deslocada através do feixe do laser, e a medida foi feita em cinco partes diferentes ao longo do comprimento do fascículo. A partir desses cinco valores, foi feita uma média aritmética que resultou num valor médio de comprimento de sarcômero para cada lâmina.

A difração a laser mede a distância entre “fendas”, ou seja, entre espaços que não impedem a passagem da luz. No caso da fibra muscular, esses espaços são as bandas I (isotrópicas = bandas claras) dos sarcômeros, mensuradas do final de uma

banda A até o início da próxima banda A. Essencialmente, está se medindo o comprimento do sarcômero. Como o feixe de laser tem um milímetro de espessura, ele medirá todos os sarcômeros compreendidos naquele feixe.

Equação 1. Equação para cálculo do número de sarcômeros em série.

$$L_s = \lambda / \sin[\tan^{-1}(x/h)]$$

Onde:

L_s : distância entre as fendas (ou média do comprimento dos sarcômeros)

λ : comprimento de onda (constante)

x : distância entre o feixe de laser e a luz difratada (medida pelo pesquisador)

h : altura da lâmina (fixada em 222 mm)

O valor de “ λ ” e de “ h ” são constantes, portanto, somente o “ x ” precisa ser determinado para mensurar o comprimento do sarcômero. No momento da difração, haverá luz difratada em ambos os lados do feixe; entretanto, a medida deve ser feita somente em um dos lados, pois as duas medidas devem ser equidistantes.

Após todas essas análises, para cada lâmina havia sido obtido o comprimento do fascículo e o comprimento dos sarcômeros. O primeiro foi dividido pelo segundo, resultando assim, num valor estimado do número de sarcômeros em série de cada fascículo.

3.7. Análise dos dados

A análise dos dados (média e desvio padrão) foi calculada para todas as variáveis, e a análise foi feita entre os grupos (EEA x IMO) e entre os membros (EXP x CON), adotando-se como normalização a comparação da perna contralateral como sendo controle (100%). Todos os valores são apresentados em valores percentuais da perna experimental em relação à perna controle (contralateral).

4 RESULTADOS

A duração média dos protocolos foi de 09:07 horas \pm 0,05. Os coelhos foram todos da raça neozelandeza, com sete meses de vida e peso médio de 5,42 Kg \pm 0,39. A média dos ângulos de fixação das articulações foi de 87,6° \pm 4,06 de flexão no joelho e 100,8° \pm 5,22 de plantiflexão no tornozelo.

A tabela 3 apresenta os valores percentuais da diminuição do comprimento dos fascículos musculares da perna experimental em relação à perna controle nos grupos. Houve diminuição do comprimento dos fascículos no grupo EEA em todos os músculos (GM, PLAN e SOL). No grupo IMO apenas o músculo GM não teve diminuição, enquanto os outros dois músculos (PLAN e SOL) apresentaram redução de seus comprimentos.

Na tabela 4, são apresentados os resultados da comparação do comprimento dos sarcômeros em série entre a perna experimental e a perna controle, e os valores são apresentados em percentual. Quanto ao comprimento de sarcômeros, o grupo EEA apresentou aumento no comprimento em todos os músculos, enquanto no grupo IMO, apenas os músculos GM e PLAN apresentaram esse fenômeno.

A tabela 5 apresenta os valores percentuais da diminuição do número de sarcômeros em série na perna experimental em relação à controle. O número de sarcômeros em série estava diminuído com maior intensidade no grupo EEA, enquanto que no grupo IMO praticamente não houve diferença entre a perna experimental e a controle.

Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) do valor percentual da diminuição do comprimento de fascículo da perna experimental em relação à perna controle.

Grupo	Músculo	Média (%)	DP
EEA	GM	16,22	18,25
	PLAN	24,10	13,85
	SOL	15,23	20,01
IMO	GM	-0,06	7,44
	PLAN	9,45	8,40
	SOL	15,41	6,79

EEA: grupo eletroestimulação artificial; IMO: grupo imobilização; GM: gastrocnêmio medial; PLAN: plantar; SOL: sóleo.

Tabela 4. Média e desvio padrão do valor percentual do aumento do comprimento dos sarcômeros da perna experimental em relação à perna controle.

Grupo	Músculo	Média (%)	DP
EEA	GM	20,09	6,91
	PLAN	7,67	4,59
	SOL	23,25	18,61
IMO	GM	3,27	5,92
	PLAN	6,57	14,35
	SOL	-0,31	2,53

EEA: grupo eletroestimulação artificial; IMO: grupo imobilização; GM: gastrocnêmio medial; PLAN: plantar; SOL: sóleo.

Tabela 5. Média e desvio padrão do percentual de perda de sarcômeros em série da perna experimental em relação à perna controle.

Grupo	Músculo	Média (%)	DP
EEA	GM	22,87	4,41
	PLAN	25,49	2,84
	SOL	29,41	6,97
IMO	GM	1,03	8,61
	PLAN	-1,98	7,60
	SOL	-1,81	11,53

EEA: grupo eletroestimulação artificial; IMO: grupo imobilização; GM: gastrocnêmio medial; PLAN: plantar; SOL: sóleo.

5 DISCUSSÃO

A proposta desse estudo foi reproduzir o estudo proposto por Tabary e colaboradores (1981), por ele ter sido o único já publicado na literatura até hoje que verificou se a eletroestimulação artificial aplicada de forma contínua e em baixa intensidade reduz o número de sarcômeros em série da musculatura plantiflexora em animais. Ambos os estudos propuseram esse protocolo para tentar reproduzir condições semelhantes às enfrentadas por pacientes portadores de espasticidade. Nossos resultados foram os mesmos encontrados por Tabary e colaboradores, e, como era esperado, houve diminuição do número de sarcômeros em série nos membros estimulados artificialmente. É importante lembrar que no grupo EEA houve uma perda média de $26,30\% \pm 5,48$, enquanto que no grupo IMO não houve perda, e a média dos músculos foi de $-0,92\% \pm 1,69$.

Apesar da imobilização exercer um papel importante na diminuição do número de sarcômeros em série (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; BAKER e MATSUMOTO, 1988; HESLINGA, KRONNIE e HUIJING, 1995), essa adaptação ocorre com, pelo menos, uma semana de imobilização. O presente estudo mostrou que com apenas dez horas de imobilização não há perda de sarcômeros em série, conforme demonstrou um estudo anterior feito com doze horas de imobilização (TABARY e col, 1981). Com o grupo IMO nós pudemos isolar os efeitos da eletroestimulação na diminuição dos sarcômeros em série, descartando possíveis interferências da posição encurtada do músculo, assim como foi visto em outro estudo no qual a musculatura foi imobilizada em posição encurtada e estimulada, e não houve diferença no número de sarcômeros em série (TABARY e col., 1981), o que confirma nossos resultados de que a perda foi exclusivamente decorrente da eletroestimulação.

As adaptações no tecido muscular observadas nesse trabalho foram bastante rápidas. Em apenas dez horas de protocolo observou-se a perda de $\frac{1}{4}$ do número de sarcômeros, o que sugere um mau prognóstico para os pacientes acometidos por patologias que envolvam a espasticidade. A rapidez da perda de sarcômeros em série pode ser atribuída ao fato de que a contração ativa dos músculos encurta bem mais rápido e com maior intensidade os sarcômeros do que a imobilização passiva

(TABARY e col., 1981; O'DWYER e col., 1989). Apesar da alta velocidade de redução de sarcômeros com eletroestimulação, em dois estudos que verificaram a recuperação da musculatura estimulada, foi encontrado um rápido retorno do número de sarcômeros em série, o que sugere que uma das maneiras de recuperar a perda de sarcômeros em série da musculatura afetada é a supressão da ativação anormal da musculatura, por exemplo, através de cirurgia (TABARY e col., 1981; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973).

Essas rápidas adaptações na estrutura muscular têm uma importância significativa na área clínica. Pessoas que sofreram alguma lesão no sistema nervoso central e que tiveram comprometimento nos centros de controle motor no cérebro, como a paralisia cerebral, frequentemente são acometidas de uma hiper-reatividade do reflexo de estiramento, que provoca contrações contínuas e hipoextensibilidade dos membros afetados (TABARY e col., 1981). O presente trabalho demonstrou que músculos acometidos por contrações contínuas mantidas por um período de pelo menos 9 horas (semelhante ao que ocorre em pacientes com paralisia cerebral que apresentam uma contração constante da musculatura flexora plantar) podem se adaptar a novas demandas, e que as mudanças encontradas na estrutura dos músculos estimulados refletem aspectos transitórios da eliminação das proteínas contráteis pela tensão exacerbada em posição encurtada a qual foram submetidos. Vale lembrar que essas adaptações não são necessariamente processo degenerativo do músculo, mas sim, processos adaptativos à nova condição imposta (JAKUBIEC-PUKA e col., 1988).

A produção de força isométrica em determinados ângulos vai ser influenciada pelo comprimento do músculo, e o comprimento do sarcômero vai ser determinado pelo número de sarcômeros em série (O'DWYER e col., 1989). Nesse estudo observamos que há uma diminuição do número de sarcômeros em série em função da posição encurtada decorrente da contração gerada pela eletroestimulação. Esse mecanismo de adaptação ocorre na tentativa de garantir a sobreposição ideal dos miofilamentos para a ligação do maior número de pontes cruzadas possível (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1973; O'DWYER e col., 1989). O que ocorre durante esse processo adaptativo é que o menor número de sarcômeros em série necessário para máxima geração de força no menor comprimento muscular determina como consequência o super-alongamento desses sarcômeros

remanescentes. Isso vai provocar uma diminuição na produção de força máxima, pois o sarcômero não consegue mais atingir o comprimento ótimo para a produção de força máxima, os miofilamentos não conseguem mais se sobrepôr da maneira mais eficiente, e a produção de força máxima será menor quando comparada à mesma estrutura antes do super-alongamento (O'DWYER e col., 1989).

Apesar desse estudo apresentar uma diminuição do comprimento dos fascículos em ambos os grupos, o grupo EEA apresentou uma média de diminuição de $18,52\% \pm 3,17$, enquanto a do grupo IMO foi de $8,26\% \pm 0,81$, isto é, a diminuição do comprimento de fascículo foi muito mais importante no grupo EEA, e o grupo IMO deve apenas ter sofrido consequências agudas da falta de movimento aliada à posição encurtada da musculatura. Quanto ao número de sarcômeros, o mesmo aconteceu, ou seja, em ambos os grupos houve um aumento do comprimento dos sarcômeros, mas no grupo EEA o aumento foi de $17\% \pm 7,51$, enquanto no grupo IMO o aumento foi de apenas $3,17\% \pm 6,08$, indicando que o aumento no comprimento dos sarcômeros é causado pela eletroestimulação, e não pela imobilização passiva.

Nosso trabalho encontrou uma diminuição bastante acentuada no comprimento de fibras no músculo sóleo quando comparada aos músculos plantar e gastrocnêmio medial, sendo esse último o de menor perda, e isso pode ser explicado de três maneiras. A primeira é pela arquitetura muscular: o músculo gastrocnêmio é mais penado do que o sóleo, portanto, a perda de sarcômeros em série é mais acentuada no segundo, já que no primeiro os sarcômeros estão arranjados mais em paralelo (HESLINGA, KRONNIE e HUIJING, 1995). Outro fator que também pode influenciar é o fato do gastrocnêmio ser um músculo biarticular e o sóleo um músculo monoarticular, e como a imobilização foi apenas do tornozelo, o músculo que sofreu maior redução foi o músculo monoarticular, já que a articulação do joelho ficou livre (GONDIN e col., 2004). Um último fator que poderia explicar essa maior perda no músculo sóleo é a tipagem de fibras de predominância em cada músculo, pois o gastrocnêmio medial é caracterizado por ser misto e o sóleo por ter maior predominância de fibras lentas, e estudos prévio indicam que fibras do tipo lenta sofrem mais os efeitos da diminuição do uso (FOURNIER e col., 1984).

Apesar de ambos os grupos terem apresentado resultados de alteração no comprimento de fascículo e de sarcômero que convergem para a mesma direção, o grupo EEA teve as maiores diferenças entre os comprimentos (de fascículo e de sarcômero), enquanto o grupo IMO não seguiu esse padrão. Por esse motivo, quando se comparou o membro que sofreu intervenção com o membro controle do próprio animal, o número de sarcômeros em série só estava diminuído no membro estimulado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho foi apenas o primeiro passo de um grande projeto que visa testar novas intervenções terapêuticas no tratamento de pacientes portadores de espasticidade. Com os resultados encontrados no presente trabalho, podemos inferir que as alterações na estrutura muscular sofridas por esses pacientes ocorrem pela constante ativação da musculatura acometida, conforme o protocolo que o presente estudo tentou reproduzir.

Agora que foram confirmadas essas condições, o próximo passo será a testagem de diferentes abordagens terapêuticas, como alongamentos para diminuir, ou até mesmo evitar, a perda de sarcômeros em série da musculatura. Esperamos que, no futuro, essas descobertas possibilitem um atendimento adequado a pacientes portadores de espasticidade, melhorando a qualidade de vida desses indivíduos.

7 REFERÊNCIAS

1. BAKER, James H.; MATSUMOTO, Dan E. *Adaptation of skeletal muscle to immobilization in a shortened position*. Muscle & nerve, 11, pp. 231-244, 1988.
2. BAX, Martin; GOLSTEIN, Murray; ROSENBAUM, Peter; LEVINTON, Alan; PANETH, Nigel. *Proposed definition and classification of cerebral palsy*. Developmental Medicine & Child Neurology, 47, pp. 571–576, 2005.
3. FRASSON, Viviane Bortoluzzi ; RASSIER, Dilson José Etcheverry ; HERZOG, Walter ; VAZ, Marco Aurélio. *Dorsiflexor and plantarflexor torque-angle and torque-velocity relationships of classical ballet dancers and volleyball players*. Revista Brasileira de Biomecânica, v. 8, p. 31-36, 2007.
4. FOURNIER, M.; ROY, R.R.; PERHAM, H.; SIMARD, C.P.; EDGERTON, V.R. *Is limb immobilization a model of muscle disuse?* Experimental Neurology, 80, pp. 147-56, 1983.
5. GONDIN, J.; GUETTE, M.; MAFFIULETTI, N.A.; MARTIN, A. *Neural activation of triceps surae is impaired following 2 weeks of immobilization*. European Journal of Applied Physiology, 93, pp. 359 – 365, 2004.
6. HESLINGA, J.H.; TE KRONNIE, G.; HUIJING, P.A. *Growth and immobilization effects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rat*. European Journal of Applied Physiology, 70, pp. 49-57, 1995.
7. JAKUBIEC-PUKA, A., KORDOWSKA, J., BELLUCO, S. & CARRARO, U. *Contractile apparatus remodelling in the shortened electrostimulated muscle*. Sarcomeric and Non-sarcomeric Muscles: Basic and Applied Research Prospects for the 90's. Padova (Italy): Padova Unipress, pp. 385-390, 1988.
8. LEITE, Jaqueline; PRADO, Gilmar. *Paralisia cerebral: aspectos fisioterapêuticos e clínicos*. Revista de Neurociências, 12(1), pp. 41-45, 2004.

9. MANCINI, Marisa C.; FIÚZA, Patrícia M.; REBELO, Jerusa M.; MAGALHÃES, Livia C.; COELHO, Zélia A. C.; PAIXÃO, Maria Lúcia; GONJITO, Ana Paula B.; FONSECA, Sérgio T. *Comparação do desempenho de atividades funcionais em crianças com desenvolvimento normal e crianças com paralisia cerebral*. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 60(2-B), pp. 446-452, 2002.
10. MORRIS, Christopher. *Definition and classification of cerebral palsy: a historical perspective*. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 49 (supl.109), pp. 3–7, 2007.
11. NIGG, Benno M.; HERZOG, Walter. *Biomechanics of the musculo-skeletal system*. 3ª edição. Ed. Wiley, 2007.
12. NUNES, Ligia Chistina. *Efeitos da eletroestimulação neuromuscular no músculo tibial anterior de pacientes hemiparéticos espásticos*. Campinas: UNICAMP, 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Campinas, 2004.
13. O'DWYER, Nicholas; NEILSON, Peter; NASH, Janet. *Mechanisms of muscle growth related to muscle contracture in cerebral palsy*. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 31, pp. 543-552, 1989.
14. PONTÉN, Eva; FRIDÉN, Jan. *Immobilization of the rabbit tibialis anterior muscle in a lengthened position causes addition of sarcomeres in series and extra-cellular matrix proliferation*. *Journal of Biomechanics*, 41, pp. 1801–1804, 2008.
15. ROTTA, Newra. *Paralisia cerebral, novas perspectivas terapêuticas*. *Jornal de Pediatria*, 78(1), pp. 48-54, 2002.
16. TABARY, Jean-Claude; TARDIEU, Catherine, TARDIEU, G.; TABARY, C. *Experimental rapid sarcomere loss with concomitant hypoextensibility*. *Muscle and Nerve*, 4, pp. 198-203, 1981.

17. TARDIEU, C.; LESPARGOT, A.; TABARY, C.; BRET, M.D. *For how long must the soleus muscle be stretched each day to prevent contracture?* *Developmental Medicine and Child Neurology*, 30, pp. 3-10, 1988.

18. WILLIAMS, Pamela E.; CATANESE, Tony; LUCEY, Edgar G.; GOLDSPINK, Geoffrey. *The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle.* *Journal of Anatomy*, 158, pp. 109-114, 1988.

19. WILLIAMS, Pamela E.; GOLDSPINK, Geoffrey. *Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle.* *Journal of Anatomy*, 127 (3), pp. 459-468, 1978.

20. WILLIAMS, Pamela E.; GOLDSPINK, Geoffrey. *The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres.* *Journal of Anatomy*, 116 (1), pp. 45-55, 1973.

21. WILMORE, Jack H; COSTILL, David L.; KENNEY, W.Larry. *Fisiologia do Esporte e do Exercício.* 4ª edição. Ed. Manole, 2010.