

Prevenção da Atrofia Muscular Induzida por Imobilização. Efeito do Exercício Físico e da Suplementação com Aminoácidos

Autores

Paula Cristina Vaz Bernardo Tavares^{1,2}; Eurico Miguel Fial Teixeira Ribeiro^{1,2}; Carlos Alberto Fontes Ribeiro^{1,3}

tavaresc.paula@gmail.com

Resumo

Uma das alterações musculares esqueléticas que mais afecta atletas e não atletas, é a atrofia muscular induzida por imobilização. Esta imobilização é, habitualmente, consequência de lesões tendinosas, fraturas, entre outras. Apesar dos actos médicos que revertem esta atrofia, caso dos atletas, o tempo de recuperação interfere nas suas participações desportivas. Assim, o ideal seria prevenir a ocorrência da atrofia muscular durante um período de imobilização em vez da aplicação de tratamentos.

O objectivo deste trabalho é verificar se a administração de BCAAs + glutamina impedem a atrofia muscular induzida por imobilização. De forma a atingir os nossos objectivos foi utilizado um modelo animal com imobilização da pata traseira.

Ratos Wistar foram sujeitos a imobilização antes e após 4 semanas de exercício físico aeróbico diário e com ou sem a administração do suplemento. O músculo estudado foi o gastrocnemius. Foram analisadas a componente macroscópica, a integridade microscópica do músculo e número e comportamento das células satélite (principais componentes da regeneração muscular esquelética).

Do nosso estudo, os resultados obtidos sugerem que o suplemento de BCAAs+ glutamina tem um efeito regenerador das células musculares. No entanto, este efeito é diminuído pelo exercício físico após imobilização. Este efeito nas células satélite não afecta, no entanto, o rácio entre a massa muscular e a massa corporal total, o que indica que o suplemento inibe a atrofia muscular, mas causa uma competição bioquímica que afecta as células satélite. Assim, tendo em conta as concentrações intrínsecas de aminoácidos e glutamina, o ajuste da dose

¹ BILI - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

² Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra

³ Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research

da suplementação pode ser uma boa opção para impedir a atrofia muscular induzida por imobilização.

Palavras-chave: Músculo Esquelético; Atrofia; Exercício Físico; BCAA; imobilização

Introdução

A atrofia muscular é uma condição transversal a vários eventos e, até estados patológicos, tais como a imobilização, o envelhecimento, vários tipos de tumores, a diabetes entre outros.

Muitos mecanismos têm sido propostos embora a totalidade dos eventos não é ainda conhecida. Não obstante, a perda de massa muscular é a face visível da atrofia muscular.

Tanto em atletas como em não atleta uma imobilização de um membro (após fractura, por exemplo) implica um estado de atrofia muscular. Acresce o facto de quanto mais treinado o músculo está mais atrofia sofre. Apesar de fisioterapia e outros actos médicos reverterem esta situação muscular o tempo de recuperação é sempre demasiado.

Os mecanismos subjacentes à atrofia muscular tem sido alvo de muitos estudos científicos, tendo sido implicados, nestes mecanismos, uma multiplicidade de factores (Dutt, et al, 2015). Não obstante, é inequívoco que a diminuição da massa muscular se deve a uma diminuição da síntese proteica com um aumento da degradação de proteínas (Glass, 2015; Zhang et al. 2008; McCarthy, 2009). As células satélite têm um papel fulcral na regeneração do músculo esquelético e estão implicadas no mecanismo de atrofia muscular, bem como na maioria dos eventos fisiopatológicos do músculo esquelético (Guitart et al., 2018).

Outros eventos relacionados são a diminuição no transporte transmembranar de aminoácidos e o aumento da oxidação dos aminoácidos de cadeia ramificada. Assim, a questão que nos surgiu foi se uma suplementação com BCAAs e glutamina poderia impedir a atrofia muscular por imobilização. Por esta razão, o objectivo deste trabalho é estudar um processo de prevenir a atrofia muscular após imobilização. Tendo em consideração que todo o processo de regeneração do músculo esquelético está intrinsecamente ligado à função das células satélite, estudámos o efeito da

suplementação na prevenção da atrofia muscular induzida por imobilização, analisando os factores de maturação, proliferação e diferenciação das referidas células.

Metodologia

Este estudo foi realizado em ratos Wistar, machos, com uma massa corporal entre 200-225g (*Charles River Laboratories*) e com uma idade de 8 semanas no início da semana.

Os animais foram acondicionados em caixas apropriada nas instalações certificadas da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, de acordo com a legislação em vigor. Os animais foram mantidos com ciclos de 12h de luz/escuro (em ciclo reverso ao dia) e com temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e humidade controladas ($50\pm 10\%$). Todos os animais tiveram livre acesso a comida e água.

Todos os procedimentos foram executados em ambiente de stress mínimo e de acordo com a legislação de proteção animal em vigor e por investigadores certificados pela DGAV.

Na primeira semana de acomodação às instalações, cada animal foi condicionado a um primeiro contacto com o sistema de passadeira rolante através de 5 minutos de caminhada a baixa velocidade.

Todas as experiências foram realizadas entre as 8 e as 10 h da manhã, de forma a respeitar o ritmo circadiano, e a manter uma rotina diária.

De acordo com os objectivos do trabalho, os animais foram divididos em sete grupos, dos quais três são controlos específicos. Assim, o primeiro grupo foi um grupo controlo, sedentário (apenas sujeito a acomodação motora uma vez por semana para evitar interferências do sistema nervoso central – área motora); um segundo grupo foi sujeito a imobilização da pata direita sem qualquer outro tratamento e um terceiro grupo realizou apenas exercício físico, cujo protocolo será explicado mais adiante nesta secção. Estabelecidos os grupos que servem de controlo no plano de trabalhos, estabelecemos mais quatro grupos: Exercício físico seguido de imobilização; Imobilização seguido de exercício físico; imobilização com suplementação oral; Imobilização com suplementação oral seguida de exercício físico.

Protocolo de imobilização

Para todos os procedimentos que possam induzir algum desconforto aos animais recorreremos à anestesia com quetamina por via intraperitoneal.

A imobilização foi realizada na pata traseira direita utilizando adesivo de imobilização hipoalergénico (*3M™ Medipore™ H Perforated Surgical Tape-2861*) de forma a prevenir a formação de úlceras de contacto ou outras alterações cutâneas ou vasculares. Seguidamente foram aplicadas duas talas laterais de polipropileno. A imobilização foi mantida por uma semana. Durante este período todos os animais foram monitorizados cuidadosamente para verificar a integridade da circulação vascular. A articulação tibiotársica foi fixada em posição de flexão plantar, a qual mantém os músculos solear e gastrocnemius na sua posição encurtada.

(*Madaro et al, 2008*).

A pata contralateral foi mantida funcional, pelo que os animais podiam circular o mais livremente possível pela caixa de manutenção onde se encontravam. Antes e após imobilização foi registada a massa corporal dos animais. Nos grupos que realizaram exercício, antes e pós imobilização, foi mantida uma semana de intervalo entre a imobilização e o protocolo de 4 semanas de exercício físico.

Protocolo de Exercício Físico

O protocolo de exercício físico consistiu em exercício aeróbico em tapete rolante adaptado do método proposto por Fontes Ribeiro et al. (2011). O protocolo de exercício consistiu na realização de corrida, diária, tendo início a uma velocidade de 6 cm/s e terminando, na 4ª semana com uma velocidade de 50 cm/s. Na última semana foi ainda incluída uma inclinação do tapete rolante de 5º, terminando na última sessão com 10º de inclinação.

Suplementação oral

Nos grupos de animais que receberam suplementação, esta foi administrada utilizando uma canula esofágica de acordo com o tamanho do animal.

A suplementação consistiu num composto com uma combinação de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) num rácio de 4:1:1 (leucina, isoleucina e

valina) e glutamina (24g/100g). Trata-se de um composto comercial utilizado na suplementação humana de atletas e praticantes de exercício físico.

A dose administrada foi a mesma que que é utilizada por humanos e nas mesmas condições. Para a preparação da administração foram diluídos 5g do suplemento em 100 ml de água. Seguidamente foram administrados, por via oral, 2 ml da solução a cada animal. O suplemento, como explicado anteriormente, foi administrado diariamente à mesma hora durante o tempo da imobilização (7 dias).

Análise histológica dos músculos

Após o término do protocolo para cada um dos grupos, os animais foram sacrificados por sobredosagem de anestésico de acordo com as normas em vigor.

Após o sacrifício foram cuidadosamente isolados alguns músculos da pata, em particular o gastrocnemius (músculo de interesse no estudo aqui apresentado). O tecido muscular foi imediatamente preparado para análise histológica com hematoxilina – eosina (HE) e análise das células satélite com marcação por anti-corpos específicos.

A marcação com HE permitiu observar a integridade das fibras e restantes estruturas musculares, bem como alterações induzidas pelos vários tratamentos aplicados.

Análise do comportamento das células satélite

Para a análise das células satélite foram utilizados cortes de músculo previamente preparados e fixados com acetona. Seguidamente foram utilizados os anticorpos primários específicos e os respectivos secundários com marcação fluorescente. Foram utilizados anti-corpos para Pax-7, Myf5 e c-met. Foi ainda utilizada a laminina (para marcação de membrana) e DAPI (para marcação dos núcleos).

Os anticorpos utilizados, diluições e respectivas procedências foram os seguintes: Pax-7 (PAX7): sc-81648 Mousse Monoclonal – Santa Cruz Biotechnology (1:500); Myf-5 (C-20): sc-302 Rabbit Polyclonal – Santa Cruz Biotechnology (1:500); Lamina A/C (4C11) Mouse mAb (Alexa Fluor® 488 Conjugate): #8617 Cell Signaling (1:200); Phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP Rabbit mAb (Alexa Fluor® 594 Conjugate): #8564 Cell Signaling (1:200)

Para a leitura da fluorescência foi usado um microscópio de fluorescência *Zeiss Axio Observer Z1*, com uma objectiva Plan-Apochromat 20x/0.8 M27, e uma câmara adaptada 0.63 *AxioCam MR R3*. Para a obtenção das imagens das amostras foi utilizado o sistema *Zen 2.3* (Blue Edition).

A identificação e contagem das células satélite foi efectuada por recurso ao software *ImageJ* v1.51n. Foi delineada a área de interesse com uma dimensão de 627x627 μ para cada imagem. Seguidamente todas as imagens foram convertidas no formato de 8 bits seguida da subtracção do “background” da imagem. Foi também feita uma segmentação 2D/3D (Soille and Vincent, 1990) seguida por uma conversão binária da imagem. A contagem final resulta da média de quatro contagens consecutivas.

Agradecimentos

Este projecto foi parcialmente financiado por:

Strategic Project UID/NEU/04539/2013), FEDER-COMPETE

Resultados

Na sequência descrita anteriormente, na metodologia, começámos por analisar o rácio entre a massa do músculo gastrocnemius (direito e esquerdo) e a massa corporal total (MG/MT) – Gráfico 1. De notar que os grupos controlo acompanharam o respectivo grupo de estudo no mesmo espaço temporal. Este ajuste permitiu que no início de cada protocolo todos os animais em estudo apresentavam idades e massas corporais equivalentes.

Tal como esperado o grupo que foi sujeito só a exercício físico apresentou um aumento no valor de MG/MT quando comparado com o respectivo controlo (sedentário). Já no grupo que foi sujeito a imobilização o rácio da pata direita (a imobilizada) apresentou um decréscimo. Esta diminuição é ainda mais acentuada quando os animais foram sujeitos a 4 semanas de exercício físico prévio relativamente à pata contralateral e ao controlo. Os animais suplementados com BCAAs e imobilizados apresentam valores semelhantes ao controlo (reverte a atrofia). Não obstante, verificou-se uma diferença entre as duas patas, uma vez que aumentou o rácio da pata contralateral. Quando após imobilização (com suplementação) os

animais são sujeitos a 4 semanas de exercício físico, o rácio apresenta um valor igual aos que realizaram apenas exercício, havendo uma total inversão da atrofia muscular. Porém, e apesar destes resultados macroscópicos há algumas alterações musculares quando analisamos a histologia dos músculos e o comportamento das células satélite, as reais responsáveis pelos processos regenerativos do músculo esquelético.

Deste modo, o exercício físico mostrou um comportamento já por nós observado em trabalhos anteriores e relacionado com a diferenciação das fibras musculares. Isto é, há um processo do tipo inflamatório com células em apoptose e outras recém-formadas – caracterizadas pelo seu pequeno tamanho e núcleo central.

Os músculos que foram previamente imobilizados apresentam: inflamação, células em apoptose, células recém-formadas e fibrose. Esta fibrose está ausente nos músculos dos animais imobilizados, mas sob suplementação, voltando a apresentar-se quando à imobilização se acresce o exercício físico.

Quando analisamos o comportamento das células satélite torna-se mais claro o efeito da suplementação e do exercício físico.

No grupo controlo, tal como seria de expectável, a expressão de Pax-7 e Myf5 indicam um estado quiescente destas células. Já no grupo que fez exercício físico durante 4 semanas, a expressão de Pax-7, Myf5 e c-met indicam a ocorrência de diferenciação das células satélite em miotubos e novas células. As células satélite do grupo com imobilização da pata direita, apresentam uma diminuição da expressão dos três factores indicando pouca ou nenhuma regeneração – Gráfico 2.

O exercício antes ou após o período de imobilização têm expressão equivalente sugerindo um efeito protector sobre a lesão induzida pela atrofia. O grupo sujeito a imobilização com suplementação apresentou um significativo aumento nos 3 factores, em particular no Mif5. Este comportamento sugere um efeito mais regenerador do que apenas o exercício físico.

No caso dos músculos que foram imobilizados, suplementados com BCAAs e realizaram exercício físico após estes procedimentos, não mostraram activação das células satélite ou capacidade de auto-renovação – Figura 1.

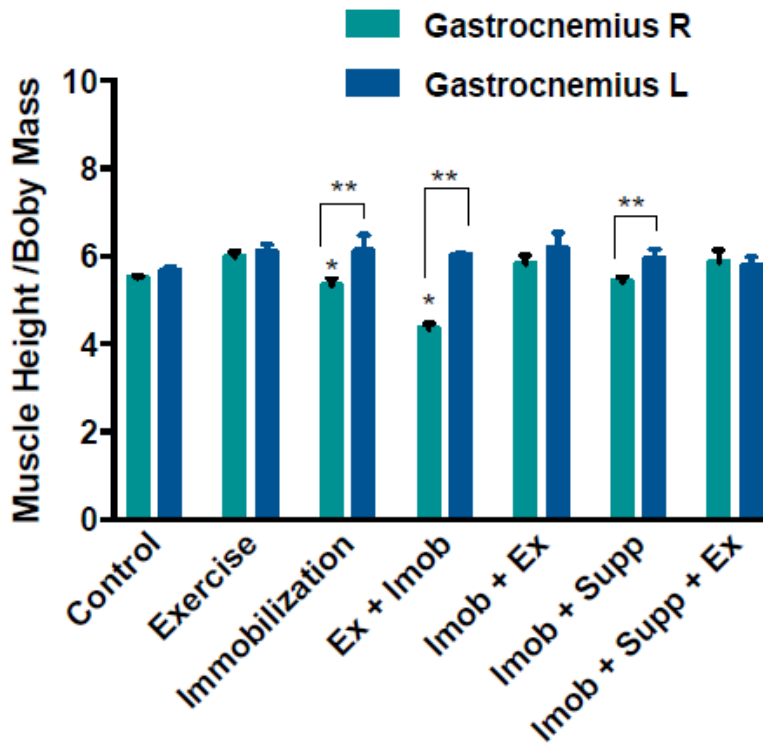


Gráfico 1

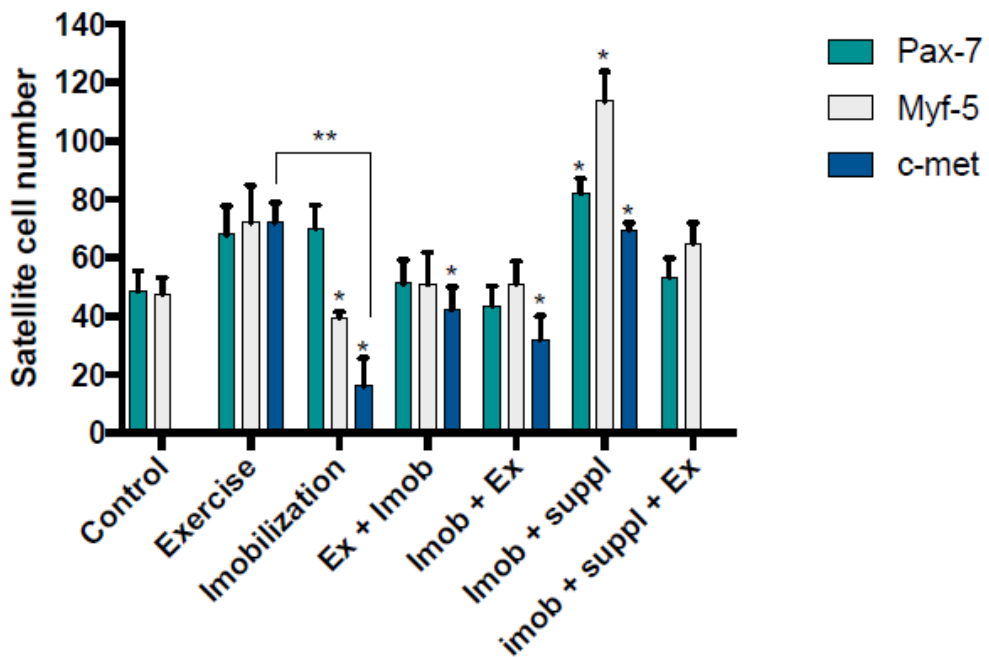


Gráfico 1

Discussão

Apesar de ser conhecido o efeito anabólico dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) (Zheng et al. 2017) não foi até agora demonstrada qualquer acção destes compostos sobre as células satélite, o que torna este trabalho totalmente inédito. Já no que se refere à administração isolada de leucina há referencia a vários estudos. Um dos mais recentes foi realizado por Lim et al (2018) em que testaram o efeito da administração de leucina sobre as células satélite tendo demonstrado que por si só a leucina não produz hipertrofia nem activação das células satélite. No entanto, verificaram que a administração de leucina combinada com exercício de resistência tinha ambos os efeitos.

Os resultados obtidos sugerem que a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada e glutamina previne a atrofia por imobilização, chegando mesmo a aumentar a massa muscular per se. Devido aos resultados obtidos pelo estudo das células satélite parece que este suplemento actua a um nível bioquímico mais do que a nível celular.

A capacidade regenerativa das células satélite observada no grupo com imobilização e suplementação e que realiza posteriormente exercício físico é paradoxal relativamente aos valores observados no rácio MG/MT. Uma possível explicação é que ocorra um efeito igual do suplemento e do exercício aumentando a quantidade de leucina e glutamina. Assim, é provável que o suplemento de BCAAs com glutamina induz resistência metabólica aos aminoácidos por um retrocontrolo negativo criado por uma elevada concentração de leucina e glutamina.

Como conclusão, o nosso estudo, sugere que o suplemento de BCAAs+ glutamina tem um efeito regenerador das células musculares. No entanto, este efeito é diminuído pelo exercício físico após imobilização. Este efeito nas células satélite não afecta, no entanto, o rácio entre a massa muscular e a massa corporal total, o que indica que o suplemento inibe a atrofia muscular, mas causa uma competição bioquímica que afecta as células satélite. Assim, tendo em conta as concentrações intrínsecas de aminoácidos e glutamina, o ajuste da dose da suplementação pode ser uma boa opção para impedir a atrofia muscular induzida por imobilização.

Bibliografia

Madaro L, Smeriglio P, Molinaro M, Bouché M. 2008. Unilateral immobilization: a simple model of limb atrophy in mice. *Basic Applied Myology* 18 (5): 149-153.

Fontes Ribeiro CA, Marques E, Pereira FC, Silva AP, Macedo TRA. 2011. May exercise prevent addiction? *Current Neuropharmacol.* 9: 45-48.

Soille P, Vincent LM. 1990. Determining watersheds in digital pictures via flooding simulations. Proc. SPIE 1360. *Visual Communications and Image Processing '90: Fifth in a Series* (1st September).

D.J. Glass, Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signalling pathways, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 1974–1984. E.E. Dupont-Versteegden, Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia, *Exp. Gerontol.* 40 (2005) 473–481.

Zhang P., Chen X., Fan M., Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy, *Med. Hypotheses* 69 (2007) 310–321. A.J. Murton, D. Constantin, P.L. Greenhaff, The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and trophic, *Biochim. Biophys. Acta* 1782 (2008) 730–743.

McCarthy J.J., Esser K.A., Peterson C.A., Dupont-Versteegden E.E., Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy, *Physiol. Genomics* 39 (2009) 219–226.

Dutt V, et al., Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action, *Pharmacol Res* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.010>

Fanzani, A., Conraads, V. M., Penna, F., Martinet, W. 2012. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 3, 163-79.

Guitart M, Lloreta J, Mañas-Garcia L, Barreiro E

Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice. [J Cell Physiol.](#) 2018 May;233(5):4360-4372. doi: 10.1002/jcp.26282.

Lim CH, Gil JH, Quan H, Viet DH, Kim CK. Effect of 8-week leucine supplementation and resistance exercise training on muscle hypertrophy and satellite cell activation in rats. *Physiol Rep.* 2018 Jun;6(12): e13725.

doi: 10.14814/phy2.13725.

Zheng L, Zuo F, Zhao S, He P, Wei H, Xiang Q, Pang J, Peng J. Dietary supplementation of branched-chain amino acids increases muscle net amino acid fluxes through elevating their substrate availability and intramuscular catabolism in young pigs. *Br J Nutr.* 2017 Apr;117(7):911-922.

doi: 10.1017/S0007114517000757.

ANEXOS

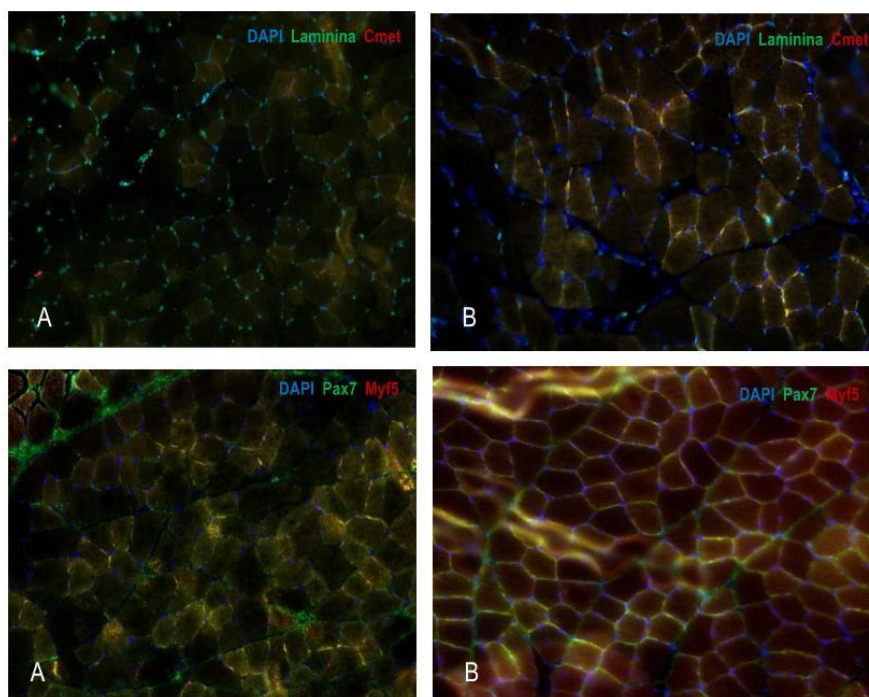


Figura 1. Aplicação de 1 semana de imobilização apenas na pata posterior direita (A – *Gastrocnemius* Direito). Pata contralateral esquerda (B – *Gastrocnemius* Esquerdo) em posição normal. Imagem representativa de Fluorescência com marcação das células satélite: DAPI (núcleo-azul), Pax7 (verde), Myf5 (vermelho) e Cmet (vermelho). X200.

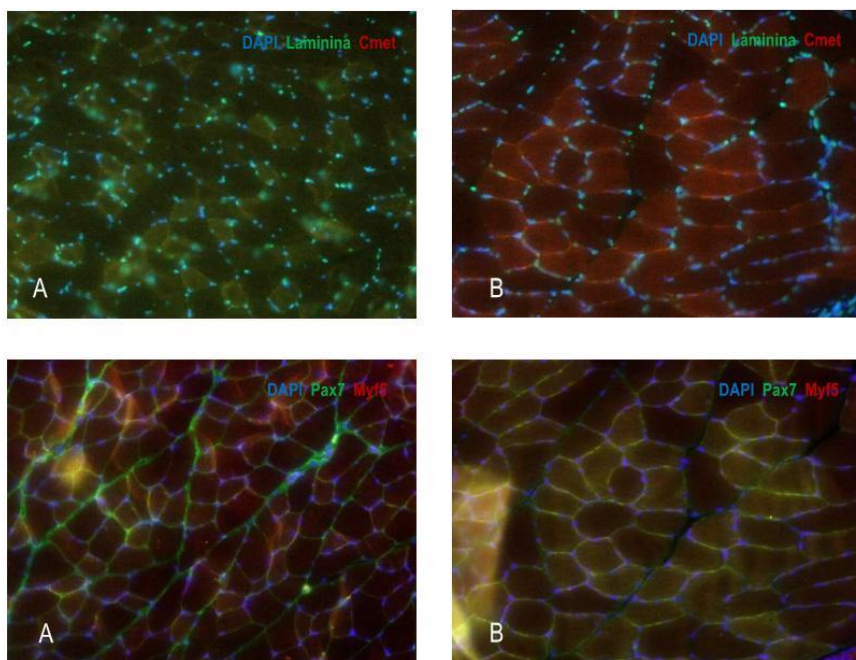


Figura 2. Protocolo de 4 semanas de exercício em tapete rolante seguido de uma pausa de uma semana, terminado com aplicação de uma semana de imobilização na pata posterior direita – contralateral em posição normal. (A – *Gastrocnemius* Direito, B – *Gastrocnemius* Esquerdo). Imagem representativa de Fluorescência com marcação das células satélite: DAPI (núcleo-azul), Pax7 (verde), Myf5 (vermelho) e Cmet (vermelho). X200.

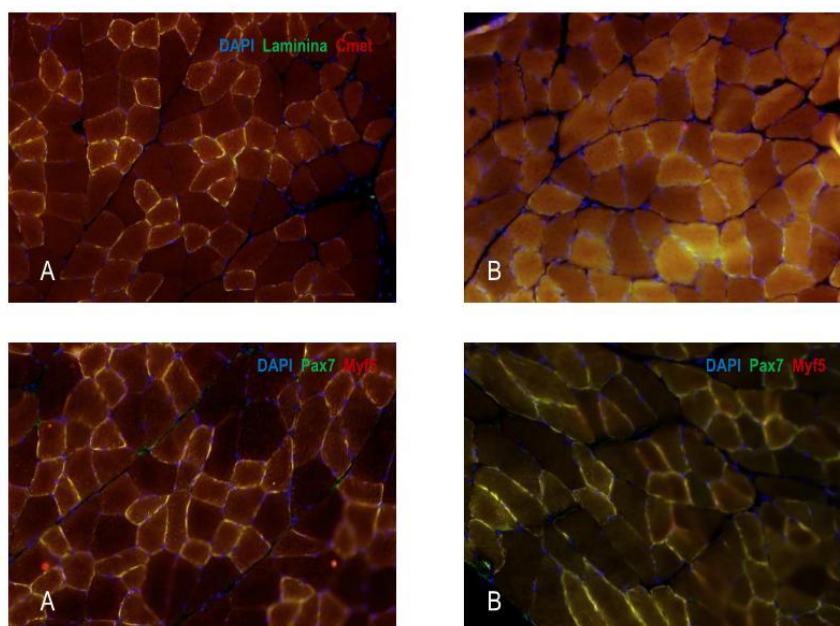


Figura 3. Protocolo de uma semana de imobilização na pata posterior direita – contralateral em posição normal - seguido de uma pausa de uma semana e 4 semanas de exercício em tapete rolante. (A – *Gastrocnemius* Direito, B – *Gastrocnemius* Esquerdo). Imagem representativa de Fluorescência com marcação das células satélite: DAPI (núcleo-azul), Pax7 (verde), Myf5 (vermelho) e Cmet (vermelho). X200.

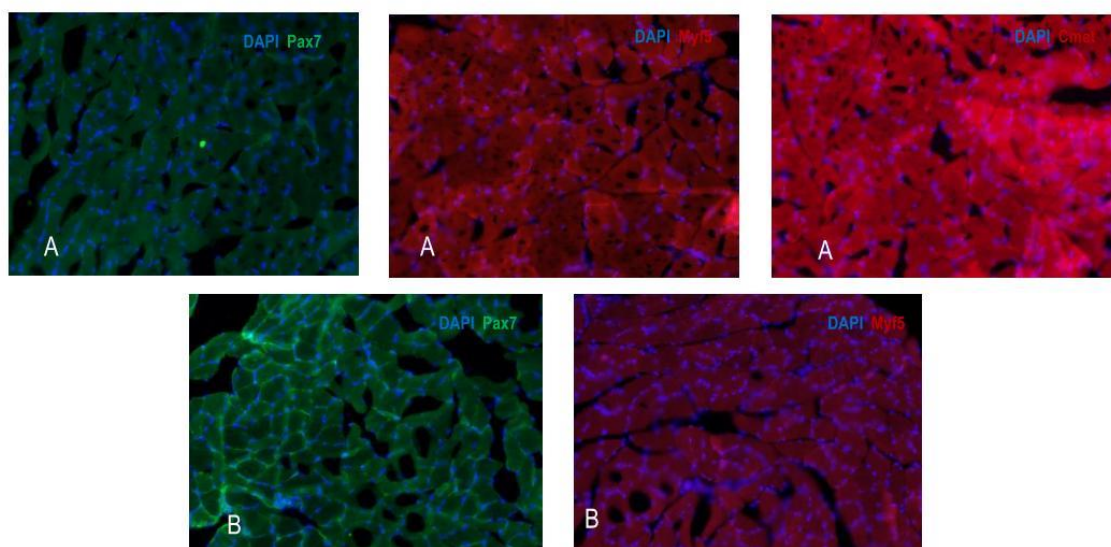


Figura 4. Regime de permanência de 4 semanas em gaiolas sem aplicação de protocolos de estudo – grupo controlo. (A – *Gastrocnemius* Direito, B – *Gastrocnemius* Esquerdo). Imagem representativa de Fluorescência com marcação das células satélite: DAPI (núcleo-azul), Pax7 (verde), Myf5 (vermelho) e Cmet (vermelho). X200.

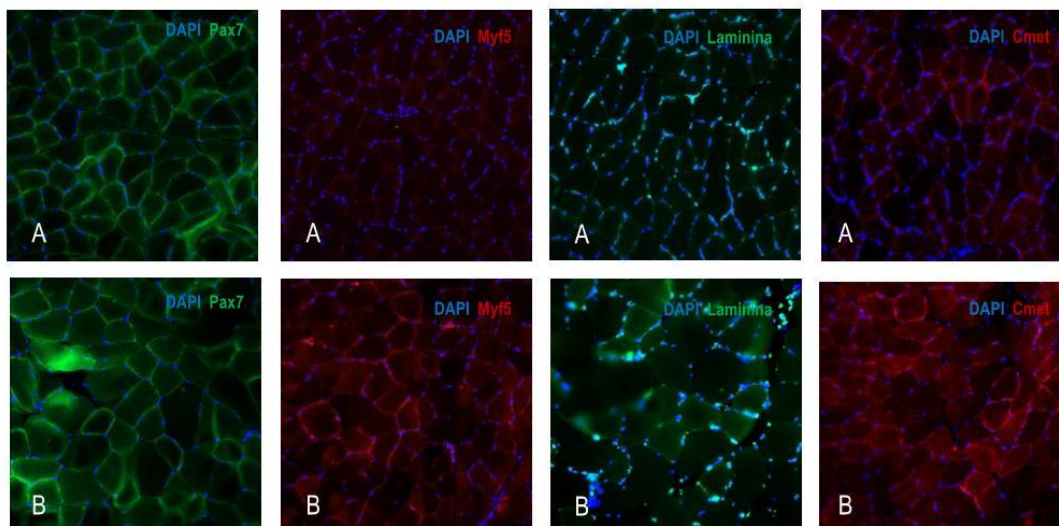


Figura 5. Protocolo de 4 semanas de exercício em tapete rolante. (A – *Gastrocnemius* Direito, B – *Gastrocnemius* Esquerdo). Imagem representativa de Fluorescência com marcação das células satélite: DAPI (núcleo-azul), Pax7 (verde), Myf5 (vermelho) e Cmet (vermelho). X200.

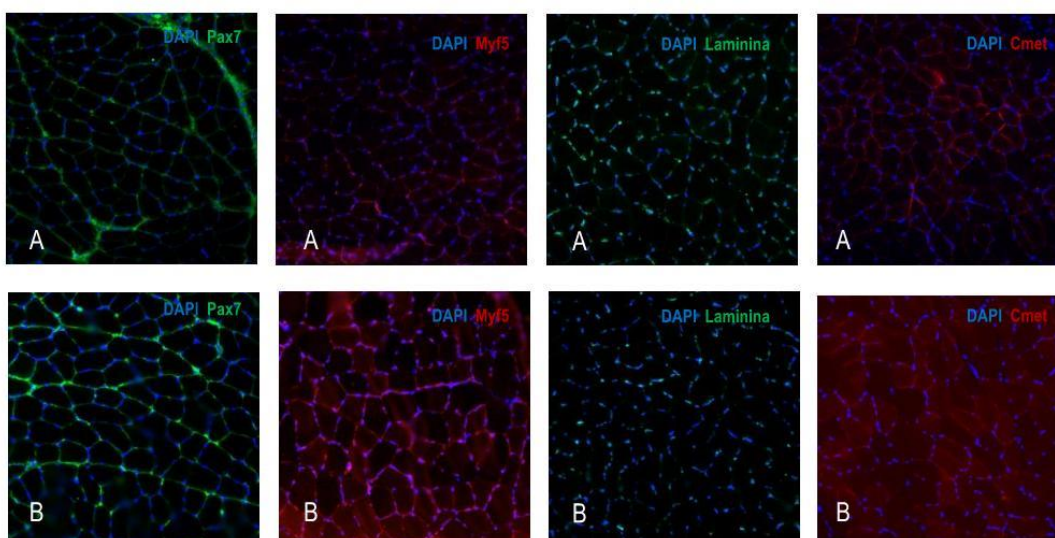


Figura 6. Protocolo de uma semana de imobilização na pata posterior direita – contralateral em posição normal – com administração simultânea de suplementação oral contendo Glutamina e Aminoácidos de Cadeia Ramificada. (A – *Gastrocnemius* Direito, B – *Gastrocnemius* Esquerdo). Imagem representativa de Fluorescência com marcação das células satélite: DAPI (núcleo-azul), Pax7 (verde), Myf5 (vermelho) e Cmet (vermelho). X200.

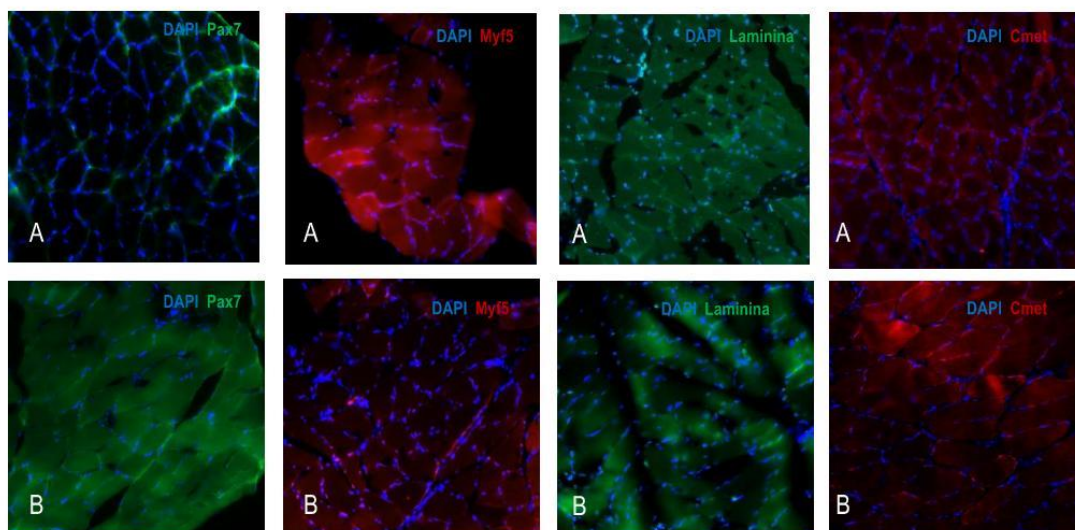


Figura 7. Protocolo de uma semana de imobilização na pata posterior direita – contralateral em posição normal – com administração simultânea de suplementação oral contendo Glutamina e Aminoácidos de Cadeia Ramificada. Seguiu-se a realização de um protocolo de 4 semanas de exercício em tapete rolante. (A – *Gastrocnemius* Direito, B – *Gastrocnemius* Esquerdo). Imagem representativa de Fluorescência com marcação das células satélite: DAPI (núcleo-azul), Pax7 (verde), Myf5 (vermelho) e Cmet (vermelho). X200.

ANTICORPOS

Pax-7 (PAX7): sc-81648 Mouse Monoclonal – Santa Cruz Biotechnology (1:500), Myf-5 (C-20): sc-302 Rabbit Polyclonal – Santa Cruz Biotechnology (1:500), Lamin A/C (4C11) Mouse mAb (Alexa Fluor® 488 Conjugate): #8617 Cell Signaling (1:200) and Phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP Rabbit mAb (Alexa Fluor® 594 Conjugate): #8564 Cell Signaling (1:200). Foram utilizados como anticorpos secundários Goat Antimouse (1:500) - Alexa Fluor® 488 and Goat AntiRabbit (1:500) – Alexa Fluor® 568.