



16° Congresso de Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DAS RESERVAS GLICOGÊNICAS DOS MÚSCULOS RESPIRATÓRIOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA ESCOLIOSE ATRAVÉS DE COLETE DE PVC: ESTUDO EM RATOS

Autor(es)

DANIEL DE OLIVEIRA GRASSI

Orientador(es)

CARLOS ALBERTO DA SILVA

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPq

1. Introdução

A escoliose envolve uma modificação estrutural das vértebras e costelas com rotação vertebral no plano transversal, desvio lateral no plano frontal e aumento das curvaturas cifóticas e lordóticas no plano sagital, o que gera transtornos tanto de origem estética quanto funcional, principalmente em crianças e adolescentes (KISNER & COLBY, 2005). No indivíduo adulto, a escoliose continua sendo uma condição de assimetria postural onde sua presença, embora também justificada por outros aspectos, é geralmente atribuída à permanência ou agravamento de um quadro oriundo da época de adolescência (AEBI, 2005).

É sabido que as deformidades vertebrais na escoliose estão intimamente relacionadas com sua patogênese. No entanto, a expressiva maioria das escolioses ainda permanece com causa desconhecida, assim representando mais de 80% de todos os casos. Conseqüentemente, muitas hipóteses têm sido apresentadas e apontam como causadores de escoliose os fatores genéticos, esqueléticos, miogênicos, tóxicos ou químicos, mecânicos ou biomecânicos, neuroendócrinos e neurogênicos (BYRD III, 1988; COILLARD e RIVARD, 1996).

Dentro da avaliação dos métodos experimentais utilizados na indução de escoliose em ratos, foi observado que na literatura há predomínio de procedimentos invasivos, aqui apresentados hierarquicamente: NOGAMI et al. (1977) administraram beta-aminopropionitrila intraperitoneal alterando os ligamentos vertebrais; BEGUIURISTAIN et al. (1980) induziram alterações na cartilagem intervertebral de ratos; TANAKA et al. (1982) produziram osteolatrismo com o fármaco carbazida; DABNEY et al. (1988) utilizaram separação mecânica das vértebras dos ratos limitando a movimentação; SARWARK et al. (1988) estudaram trauma na coluna dos ratos; KASUGA (1994) fez sutura nos músculos próximos às vértebras limitando a movimentação; MACHIDA et al. (1999) fizeram pinealectomia nos ratos e sugeriram relações entre a

concentração plasmática de melatonina e alterações posturais; STOKES et al. (2002) estudaram alterações mecânicas das vértebras que comprometem o crescimento dos condrócitos; MACHIDA et al. (2006) estudaram escoliose experimental em ratos com deficiência genética na síntese de melatonina.

Por ser um tema tão abrangente, a maioria das pesquisas conduzidas sobre escoliose tem direcionado seus esforços principalmente no que diz respeito à deformidade produzida na superfície corpórea, e sua relação com a deformidade anatômica estrutural pela rotação dos corpos vertebrais e a magnitude da angulação na curva escoliótica, além do comprometimento na funcionalidade dos músculos respiratórios.

Clinicamente, tem sido relatado que concomitante ao processo escoliótico há hipotonia e fraqueza muscular difusa (ROSO et al., 2003). Dentre os músculos mais vulneráveis ao enfraquecimento, tem sido relatado que os paravertebrais e principalmente os respiratórios são os mais afetados devido ao efeito restritivo do quadro (TANGSRUD et al., 2001).

Cabe ressaltar que os estudos citados acima se diferenciam do método aqui utilizado, pois no colete utilizado predomina o caráter não invasivo.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi aplicar um colete de filme de policloreto de vinil (PVC) em ratos desde as fases iniciais de crescimento (pós-desmame) até a décima segunda semana de vida, no intuito de induzir escoliose por meio da imobilização da coluna e analisar o perfil quimio-metabólico de músculos específicos da caixa torácica envolvidos na respiração.

3. Desenvolvimento

Para o procedimento experimental, 12 ratos machos foram divididos em grupos controle e imobilizados com o colete a partir da data do desmame até a décima segunda de vida. Os animais foram alimentados com ração e água ad libitum e submetidos a ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro (n=6/grupo).

Pautado no fato de demonstrar-se como um método eficaz e de baixo custo para a indução de escoliose, o Grupo Metabolismo utilizou órteses de filme de PVC para o experimento. Estas foram compostas por duas partes, um colete situado na região escapular e outro na pélvica, que por sua vez eram aproximadas com arame no lado direito, assim produzindo uma curvatura no alinhamento postural do animal. Para acompanhar o crescimento dos ratos, o conjunto foi trocado a cada sete dias.

Foi optado por avaliar o peso dos animais, o conteúdo de glicogênio dos músculos intercostais e peitorais do lado direito e esquerdo e também o diafragma, bem como a relação proteína total/DNA. Para isso, uma análise quimio-metabólica foi realizada nas amostras de acordo com a metodologia correspondente a cada avaliação.

Para a determinação do glicogênio muscular foi realizada a proposta de Siu et al. (1970), enquanto a quantificação da concentração de proteínas totais foi realizada por kit laboratorial, e a determinação da concentração de DNA muscular usufruiu do método proposto por Giles e Myers (1965). Por fim, a concentração de insulina plasmática foi avaliada de acordo com o método descrito por Scott et al. (1981).

Para análise estatística foi utilizada a avaliação de normalidade seguido do teste de Tukey, $p < 0,05$.

4. Resultado e Discussão

Inicialmente o estudo foi direcionado a avaliação da variação do peso corporal dos animais durante as 12 semanas e foi observado que os animais que receberam o colete para indução da escoliose apresentaram pesos médios 29% menores se comparado aos animais que não receberam o colete.

A seguir, foi avaliada a concentração de proteína total dos músculos relativos ao estudo e observou-se que houve redução média de 33% em decorrência da escoliose. No mesmo aspecto de análise, foi avaliada a concentração de DNA dos mesmos músculos e verificou-se que em média houve redução de 32% em decorrência da escoliose.

Por sua vez, optou-se por avaliar a relação proteína total/DNA (PT/DNA), sendo verificado que nos músculos coletados dos ratos escolióticos a relação PT/DNA foi menor, atingindo 19% no diafragma, 25% no músculo intercostal direito, 11% no músculo intercostal esquerdo, 8% no peitoral direito e 17% no peitoral esquerdo.

A seguir foram avaliadas as reservas musculares de glicogênio comparando o grupo controle (C) ao escoliótico (ES). Os dados mostram que não houve modificação nas reservas glicogênicas do músculo diafragma, por outro lado, as reservas dos demais músculos foram significativamente reduzidas ($p < 0,05$), atingindo valores 41% no músculo intercostal direito ($0,51 \pm 0,04$ C x $0,30 \pm 0,005$ ES), 67% no intercostal esquerdo ($0,55 \pm 0,005$ C x $0,18 \pm 0,009$ ES), 44% no peitoral direito ($0,50 \pm 0,06$ C x $0,28 \pm 0,009$ ES), 60% no peitoral esquerdo ($0,49 \pm 0,03$ C x $0,20 \pm 0,01$ ES), e 45% no músculo abdominal ($0,58 \pm 0,04$ C x $0,32 \pm 0,05$ E), assim demonstrando uma inter-relação funcional entre a manutenção da atividade contrátil e a efetividade das vias metabólicas.

Por fim, frente às alterações químio-metabólicas expressas nos músculos coletado de ratos escolióticos, foi optado por avaliar o índice de HOMA (Homeostatic Model Assessment) que indica resistência à insulina (HOMA-IR). Sendo assim, observou-se que nos grupos controle e escolióticos os valores do HOMA-IR foram $0,81 \pm 0,02$ no grupo controle enquanto o grupo escoliótico demonstrou redução estatisticamente significativa, pois seu valor foi $0,66 \pm 0,03$, estando 18% abaixo do controle.

Um ponto a se considerar é que os animais escolióticos apresentaram peso menor do que o controle, o que pode estar relacionado com diminuição na ingestão de ração, já que esta passou de $60 \pm 5,0$ g/dia no grupo controle para $45 \pm 3,0$ g/dia no grupo escoliótico. Possivelmente, os mecanismos associados ao processo de indução da escoliose promovam alterações nas respostas do sistema nervoso central, em especial o hipotálamo com reflexos comportamentais ligados a área da fome e a ingestão sólida com ação similar ao conjunto de respostas que acompanham os eventos caracteristicamente observados por Brandão (1995).

Os mesmos músculos foram comparados de ambos os lados nos ratos escolióticos, foi verificado que no lado esquerdo (convexo) a relação proteína total/DNA foi maior, o que sugere que o tecido estriado possa estar ganhando sarcômeros em série por estar sob tensão, uma vez que é sabido que o alongamento estimula este tipo de sarcomerogênese (WILLIAM, 1990).

Dentro de uma abordagem mais primorosa, deve-se destacar que quando se estuda modelos experimentais propostos para a indução da escoliose, se pode descartar que a imobilização gerada pela metodologia aqui utilizada seja um processo causador de desuso muscular, pois sabe-se que situações como fixações de membros, microgravidade, e a utilização de órteses desencadeiam um estado catabólico nos músculos estriados (FERRANDO et al., 1996; AQUINO et al., 2005). Assim, a menor relação proteína total/DNA observada nos músculos da caixa torácica pode estar representada pela ação de sistemas catabólicos que acompanham o desuso.

Dentro de um perfil endócrino, sabe-se que há hormônios que participam da regulação e modulação do metabolismo de carboidratos da musculatura esquelética, onde a insulina exerce uma extrema importância (SESTI, 2006). Foi analisado o índice HOMA-IR, após verificou-se que houve alteração nas reservas glicogênicas das fibras musculares do grupo escolióticos, verificou-se que o índice estava reduzido, assim indicando comprometimento na sensibilidade insulínica (OLIVEIRA et al., 2005).

Cabe ressaltar que avaliações dos fenômenos ligados à sensibilidade insulínica ainda merecem maiores estudos, no entanto, as alterações químio-metabólicas aqui demonstradas podem participar dos

mecanismos implantados concomitante ao desenvolvimento da escoliose e refletem uma interface anatomo-funcional que merece maior atenção e estudo.

5. Considerações Finais

O colete de PVC utilizado no processo de indução da escoliose promoveu alterações fisiológicas nos músculos estudados da caixa torácica, com reflexo nas reservas glicogênicas, na relação proteína total/DNA e na sensibilidade à insulina, deste modo sugerindo que modificações na homeostasia da musculatura da caixa torácica acompanham o processo indutor da escoliose.

Referências Bibliográficas

- AEBI, M. The adult scoliosis. *Eur Spine J*, v.14, n.10, p.925-948, 2005.
- AQUINO C.F.; VIANA S.O.; FONSECA S.T. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e a imobilização. *Fisio em Mov*, v.18, n.2, p.35-43, 2005.
- BEGUIRISTAIN, J.C.; DE SALIS, J.; ORIAIFO, A.; CANADELL, J. Experimental scoliosis by epiphysiodensis in pigs. *Int Orthop*, v.3, n.4, p.211-214, 1990.
- BRANDÃO, M.L. *Psicofisiologia*. Rio de Janeiro: Atheneu; 1995.
- BYRD III, J.A. Current theories on the etiology of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop*, v.229, n.14, p.114-119, 1988.
- COILLARD, C.; RIVARD, C.H. Vertebral deformities and scoliosis. *Eur Spine J*, v.5, n.2, p.91-100, 1996.
- DABNEY, K.W.; SALZMAN, S.K.; WAKABAYASHI, T. Experimental scoliosis in the rat. *Spine*, v.13, n.5, p.472-477, 1988.
- DELP, M.D.; DUAN, C. Compositions and size of type I, IIA, IID/D and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl Physiol*, v.80, n.1, p.261-270, 1996.
- FERRANDO, A.A.; LANE, H.W.; STUART, A.A.; DAVIS-STREET, J.; WOLFE, R.R. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am J Physiol*, v.270, n.4, p.627-633, 1996.
- GILES, K.W.; MYERS, A. An Improved Diphenylamine Method for the Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, v.206, n.93, p.324-330, 1965.
- GOLL, D.E.; STROMER, M.H.; ROBSON, R.M. Skeletal muscle, nervous system, temperature regulation and special senses. In *Duke's Physiology of Domestic Animals* (M. J. Swenson, Ed.), 9th ed, p.504-530, 1977. Cornell University Press, New York.
- KASUGA, K. Experimental scoliosis in the rat spine induced by binding the spinous processes. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, v.68, n.9, p.789-807, 1994.
- KISNER, C.; COLBY, L.A. *Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas*, 4. ed. São Paulo: Manole, 2005.
- LANCHA, J. *Nutrição e metabolismo aplicados à atividade motora*. Atheneu editora, 2º ed, 2002.
- MACHIDA, M.; MURAI, I.; MIYASHIDA, I.; DUBOUSSET, J.; YAMADA, T.; KIMURA, J. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Spine*, v.1, n.24, p.1985-1989, 1999.
- MACHIDA, M.; DUBOUSSET, J.; YAMADA, T.; KIMURA, J.; SAITO, M.; SHIRAISHI, T.; YAMAGISHI, M. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy. *J Pineal Res*, v.41, n.1, p.1-7, 2006.
- NOGAMI, H.; TERASHIMA, Y.; TAMAKI, K. Congenital kyphoscoliosis and spinal cord lesion produced in the rat by beta-aminopropionitrile. *Teratology*, v.16, n.3, p.351-377, 1977.

- OLIVEIRA, E.P.; SOUZA, M.L.A.; LIMA, M.D.A. Índice HOMA (homeostasis model assessment) na prática clínica: uma revisão. *Bras Patol Med Lab*, v.41, n.4, p.237-243, 2005.
- ROSO, V.; BITU, S.O.B.; ZANOTELI, E.; BETETA, J.T.; CASTRO, R.C.; FERNANDES, A.C. Tratamento cirúrgico da escoliose na amiotrofia espinhal progressiva. *Arq Neuropsiquiatr*, v.61, n.3-A, p.631-638, 2003.
- SARWARK, J.F.; DABNEY, K.W.; SALZMAN, S.K. Scoliosis in the rat, methodology, anatomic features. *Spine*, v.13, n.5, p.466-471, 1988.
- SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*, v.21, n.5, p.470-475, 1981.
- SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 20 (4): 665-679, 2006.
- SIU, L.; RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*, v.28, n.2, p.234-236, 1970.
- STOKES, I.A.; GWADERA, J.; DIMOCK, A.; ARONSSON, D.D. Mechanical modulation of vertebral and tibial growth: diurnal versus full-time loading. *Study Health Technol Inform*. v. 91, p. 97-100, 2002.
- TANAKA, H.; KIMURA, Y.; UJINO, Y. The experimental study of scoliosis in bipedal rat. *Arch Orthop Trauma Surg*, v.101, n.1, p.18-27, 1982.
- TANGSRUD, S.E.; CARLSEN, K.C.L.; LUND-PETERSEN, I.; CARLSON, K.H. Lung function measurements in young children with spinal muscle atrophy; a cross sectional survey on the effect of position and bracing. *Arch Dis Child*, v.84, n.90, p.521-524, 2001.
- WILLIAM, P.E. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. *Ann Rheum Dis*, v.49, n.5, p.316-317, 1990.