

# ESTUDO COMPARATIVO DO ENVELHECIMENTO DO SISTEMA CAPILAR DOS MÚSCULOS: DIAFRAGMA E RETO ANTERIOR DO ABDOME EM RATOS. FUTURO MODELO PARA O ESTUDO DE ATIVIDADE FÍSICA?

A COMPARATIVE STUDY ON THE AGING PROCESS OF MUSCLES' CAPILLARY SYSTEM: DIAPHRAGM AND RECTUS ABDOMINIS IN RATS.

A FUTURE MODEL FOR PHYSICAL ACTIVITY STUDIES?

LUIZ E. GARCEZ LEME<sup>1</sup>, CONSUELO JUNQUEIRA RODRIGUES<sup>2</sup>, ALDO JUNQUEIRA RODRIGUES JR.<sup>3</sup>, EURICO THOMAZ DE CARVALHO FILHO<sup>4</sup>, MARIANA DECKERS LEME<sup>5</sup>, TOMÁS P. LEIVAS<sup>6</sup>.

## RESUMO

No presente estudo as alterações etárias no sistema capilar foram investigadas nos músculos diafragma e reto anterior do abdome em ratos de 1, 8 e 18 meses de idade. Os padrões de ativação destes músculos diferem em que o diafragma é regularmente mobilizado muitas vezes a cada minuto durante toda a vida do animal, enquanto o reto anterior do abdome, embora mobilizado na respiração seja ativado de maneira muito menos freqüente e regular. As fibras musculares foram pré-incubadas em pH 4,35 e fixadas pelo método de Padykula e Herman para estudar a atividade miofibrilar da ATP-ase, tornando possível a separação das fibras em três grupos: oxidativa lenta (I); glicolítica oxidativa rápida (IIA) e oxidativa rápida (IIB) e a identificação dos capilares ao redor das fibras no mesmo corte. A relação capilar/fibra e a densidade capilar foram obtidas. A análise da relação capilar/fibra e da área entre os dois tipos musculares mostrou padrões diferentes de desenvolvimento capilar, no envelhecimento, das fibras não fatigáveis (I e IIA) do músculo diafragma em comparação com o reto anterior do abdome. Estas diferenças etárias do diafragma e reto anterior do abdome poderiam estar relacionadas à contínua contração diafragmática e poderia vir a ser este um modelo natural de exercício permanente e envelhecimento muscular.

**Descritores:** Envelhecimento, Diafragma, Exercício.

## SUMMARY

In the present study, the age-related changes of the capillary system were investigated in the diaphragm and rectus abdominis muscles of 1, 8, and 18-month-old rats. The activation patterns of these muscles differ in the sense that the diaphragm is regularly mobilized many times at each minute during the entire life of the animal, while the rectus abdominis, although mobilized during breathing, is much less and more irregularly activated. The muscular fibers were pre-incubated in pH 4.35 and stained by the Padykula and Herman method to study of ATP-ase myofibrillary activity, enabling the separation of the fibers into 3 groups: slow oxidative (I); glycolitic fast oxidative (IIA) and fast oxidative (IIB) and the identification of the capillary around the fibers in the same section. The capillary/fiber relationship and the capillary density were obtained. The analysis of the capillary/fiber relationship and of the area between the 2 muscular groups showed us different patterns of capillary development, in aging, of diaphragm muscle's non-fatigable fibers (I and IIA) in comparison to rectus abdominis. These age-related changes of the diaphragm and rectus abdominis muscles could be related to continuous diaphragm contraction and could be a natural model of permanent exercise and muscle aging.

**Keywords:** Aging, Diaphragm, Exercise.

## INTRODUÇÃO

O exercício é considerado possivelmente um fator protetor no envelhecimento muscular<sup>(1)</sup>, podendo eliminar diferenças etárias. Diferenças estruturais no diafragma, devidas ao processo de envelhecimento têm sido descritas<sup>(2,3,4)</sup> mas poucos estudos têm abordado as alterações do padrão capilar tanto no músculo diafragma (DIA) quanto no músculo reto anterior do abdome (RA) durante o envelhecimento, sendo possível imaginar-se algum grau de relação entre a organização capilar e a capacidade oxidativa das fibras.

Pouco se sabe sobre a relação capilar/músculo dos músculos esqueléticos e as mudanças que ocorrem em função da idade

e de seu padrão de mobilidade funcional. Assim, o presente estudo foi realizado para avaliar as alterações etárias da relação capilar/fibra e a densidade capilar de dois músculos ativados diferentemente: o DIA que contrai regularmente muitas vezes por minuto, durante toda a vida do animal e o RA cuja ativação é muito menos freqüente.

## MATERIAL E MÉTODOS:

Trinta ratos Wistar machos foram usados nesta investigação. Grupos de 10 animais foram sacrificados 1, 8 ou 18 meses após o nascimento, sendo denominados neste estudo como grupo jovem, adulto e velho, respectivamente. O peso médio dos animais

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

Endereço para Correspondência: Av. Angélica, 1.071 apto. 112 - CEP 01227-100 - São Paulo - SP - e-mail: lueglem@usp.br

1. Professor, Doutor, Livre Docente e Associado do Departamento de Ortopedia e Traumatologia
2. Professora, Doutora, Livre Docente e Associada do Departamento de Cirurgia
3. Professor Titular do Departamento de Cirurgia
4. Professor, Doutor, Livre Docente da Disciplina de Geriatria.
5. Mestranda do Departamento de Medicina Preventiva.
6. Engenheiro, Mestre em Ciências do Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Trabalho recebido em: 17/05/05 aprovado em 06/07/05

em gramas ( $\pm$  DP) foi  $68 \pm 10,06$ ,  $420 \pm 37,15$  e  $458 \pm 43,34$  g, respectivamente. Os animais receberam água e ração padrão *ad libitum*. Devido a problemas técnicos, principalmente relacionados à obtenção da coloração exata para tornar possível a identificação de capilares tipos de fibra na mesma lamina, apenas o material referente a 13 ratos pode ser usado no estudo final.

### Isolamento do tecido

Os animais foram sacrificados por inalação com éter. Após a morte, uma secção transversal do RA e todo o DIA costal direito foi obtido. Fitas representativas do DIA e do RA foram fixadas em "Swiss roll" e submetidas ao hexano, previamente refrigerado em nitrogênio líquido ( $-70^{\circ}\text{C}$ ). Cortes seriados de  $10\mu$  foram, então, realizados.

### Coloração

Várias preparações para pré-incubação em diferentes pHs foram testadas para permitir a observação, no mesmo corte, dos três tipos de fibra e dos capilares ao redor das fibras. Isto foi obtido com uma pré-incubação de pH 4,35.

Os cortes foram, então, submetidos à pré-incubação em pH 4,35 e submetidos à técnica de Padykula-Herman para atividade microfibrilar de ATPase<sup>(5)</sup>.

### Avaliação morfométrica

Os cortes foram submetidos a estudo em microscópio de câmara aberta e registrados em papel. Os registros foram, então, analisados para determinação da área das fibras usando um sistema planimétrico e uma mesa digitalizadora ligada a um computador. O número de capilares ao redor de cada fibra foi contado manualmente. Entre 47 e 140 fibras foram, em 3 a 16 campos, escolhidos aleatoriamente em cada animal. Estes dados permitiram-nos conhecer a relação capilar/fibra e a densidade capilar para cada tipo de fibra (I, IIA e IIB) tanto para o DIA quanto para o RA.

### Análise estatística

Os dados foram analisados por variância (Kruskal-Wallis). Quando positivos os resultados foram submetidos à análise para comparações múltiplas modificada por Dunn. Cada grupo etário para o DIA e RA pelo teste de significância de Mann-Whitney. A significância foi definida em 5%.

## RESULTADOS

Nós pudemos observar, inicialmente, um padrão similar nos parâmetros medidos tanto no DIA (Tabela 1) quanto no RA (Tabela 2) em animais jovens, quando comparados nesta idade (um mês). Por outro lado, quando analisamos o padrão de envelhecimento pudemos observar uma diferença nos músculos DIA e RA. Em ambos os músculos e em todas as idades as fibras IIB (rápidas fatigáveis) apresentaram padrão de vascularização diminuída em relação às lentas não fatigáveis (I) ou às rápidas (IIA). (Tabelas 1 e 2)

No DIA, na relação C/F e na DC nós pudemos observar um padrão de envelhecimento caracterizado por mudanças objetivas entre o grupo jovem e o adulto, mas não entre o grupo adulto e o velho. No RA nós pudemos observar na relação C/F e na CD um padrão de envelhecimento caracterizado por mudanças objetivas entre os grupos jovem, adulto e velho.

Quando nós analisamos os grupos: jovem, adulto e velho pelo teste de Mann-Whitney pudemos observar um padrão mais intenso de envelhecimento no RA quando comparado ao DIA.

## DISCUSSÃO

O envelhecimento muscular provavelmente está associado a múltiplos fatores. Velhos que mantiveram atividade diária regular (por ex. caminhadas) parecem apresentar um melhor padrão de capilarização e cinética de  $\text{VO}_2$  durante o exercício<sup>(6)</sup>. O DIA parece apresentar um padrão diferente de envelhecimento quando comparado com outros músculos estriados. Por um lado o envelhecimento está associado com uma diminuição da produção de força tetânica máxima em ratos envelhecidos<sup>(7)</sup>. Por outro lado, o DIA parece apresentar diferenças, no envelhecimento, em relação a outros músculos estriados, observando-se que exercícios de alta intensidade, até a exaustão, resultam em fadiga significativa da contratilidade do músculo quadríceps mas não do diafragma, em indivíduos velhos saudáveis, relativamente sedentários<sup>(8)</sup>. Gosselin descreveu que em 344 ratos Fisher fêmeas, submetidos a exercício, o tamanho da fibra e a densidade capilar não diferiram entre ratos jovens e senescentes, nem o exercício afetou estas medidas. Além disso, o diafragma parece manter sua capacidade oxidativa e microvascularização com o progresso da idade<sup>(9)</sup>.

Neste estudo, pudemos observar diferentes padrões de capilarização no envelhecimento dos músculos DIA e RA. Nos dois grupos e em todas as idades, as fibras IIB (rápidas, fatigáveis) apresentaram padrão de diminuição de vascularização em relação a fibras não fatigáveis lentas (I) ou rápidas (IIA). Provavelmente a baixa capacidade oxidativa das fibras IIB poderia explicar a diminuição da capilarização observada neste tipo de fibra.

Uma limitação do presente estudo é a amostra relativamente pequena que foi utilizada. Esta limitação deveu-se às dificuldades implícitas à adequação do pH para possibilitar a visualização dos tipos de fibra e dos capilares nos mesmos corte, bem como ao fato de se trabalhar com microscopia de câmara aberta. No entanto a literatura registra outros autores trabalhando com número igualmente limitado de animais.

No DIA pudemos observar um modelo de envelhecimento caracterizado por mudanças objetivas entre os grupos de indivíduos jovens e adultos, no referente à área das fibras e à densidade capilar, não havendo mudanças estatisticamente significantes, no envelhecimento, da relação capilares/fibra, exceto nas fibras rápidas (tipo IIB). Quando comparados os grupos de adultos e velhos foi possível observar que não havia mudanças significativas entre os dois grupos para nenhum dos parâmetros adotados.

Fibra		TIPO I		TIPO II-A		TIPO II-B	
Animal	mês	C/F	D. Cap	C/F	D. Cap	C/F	D. Cap
MÉDIA	1	3,442	6,867	4,424	8,145	3,993	4,570
D.P.		0,807	1,953	0,690	1,065	0,834	1,592
MÉDIA	8	4,740	2,324	5,601	2,431	6,304	1,532
D.P.		0,238	0,275	0,374	0,126	0,376	0,147
MÉDIA	18	4,632	2,294	5,536	2,162	6,782	1,584
D.		0,874	0,538	0,521	0,120	0,622	0,182
K-Wallis		p=0,153	p=0,055	p=0,231	<b>p=0,025</b>	<b>p=0,048</b>	p=0,057
Wilcoxon		p=0,723	p=0,723	p=1,00	p=0,077	p=0,888	p=1,00

Tabela 1 - Variáveis Medidas no Músculo Diafragma

Fibra		TIPO I		TIPO II-A		TIPO II-B	
Animal	mês	C/F	D. Cap.	C/F	D. Cap.	C/F	D. Cap.
<b>MÉDIA</b>	1	3,768	6,262	4,733	6,500	4,740	2,925
<b>D.P.</b>		0,198	1,386	0,037	2,011	0,021	0,518
<b>MÉDIA</b>	8	3,606	2,422	5,155	1,699	5,999	0,758
<b>D.P.</b>		0,423	0,226	0,375	0,289	0,689	0,130
<b>MÉDIA</b>	18	4,495	2,378	6,690	1,796	7,374	0,737
<b>D.P.</b>		0,213	0,264	0,120	0,207	0,877	0,051
<b>Kruskal-Wallis</b>		<b>p=0,027</b>	<b>p=0,029</b>	<b>p=0,015</b>	<b>p=0,015</b>	<b>p=0,029</b>	<b>p=0,030</b>
<b>Wilcoxon</b>		<b>p=0,033</b>	<b>p=0,723</b>	<b>p=0,033</b>	<b>p=0,077</b>	<b>p=0,723</b>	<b>p=1,00</b>

**Tabela 2 - Variáveis Medidas no Músculo Reto do Abdome**

No RA observamos um modelo de envelhecimento caracterizado por mudanças estatisticamente significantes entre os grupos jovem, adulto e velho para todos os tipos de fibras estudados. Na comparação dos grupos adulto e velho foi possível observar mudanças estatisticamente significantes no tocante à relação capilar/fibra para as fibras não fatigáveis (I e II-A), assim como no referente à área seccional das fibras fatigáveis rápidas (II-B); não havendo significância estatística no restante das comparações, pudemos deste modo definir um modelo de envelhecimento diferente para o músculo reto anterior do abdome em relação ao DIA.

Na análise da densidade capilar dos dois grupos musculares pudemos observar que as mudanças na relação capilar/fibra foram, de algum modo, compensadas pelas diferentes alterações da área das fibras, de maneira que, em animais velhos, a densidade capilar é equivalente no diafragma e nos músculos reto abdominais.

Os dados obtidos permitem concluir que há diferença objetiva entre os modelos de envelhecimento do diafragma e músculos

reto abdominais e uma possível "proteção", principalmente em relação às fibras resistentes à fadiga no envelhecimento do DIA. A condição de contratilidade freqüente desse músculo poderia estar associada a estes resultados.

De qualquer maneira, estes resultados, necessariamente limitados, poderão estimular outros pesquisadores a se debruçarem sobre o desafio de achar modelos experimentais simples e confiáveis de atividade física e seu impacto no processo de envelhecimento do aparelho locomotor.

## CONCLUSÃO

Os dados nos permitem concluir que existe uma diferença efetiva no padrão de envelhecimento entre o DIA e o RA, principalmente em relação ao padrão capilar de fibras resistentes à fadiga. A contração contínua do DIA, como um modelo natural de exercício contínuo poderia ser uma das possíveis explicações para isso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias EB, Gosselin LE, Cartee GD. Exercise training eliminates age-related differences in skeletal muscle insulin receptor and IRS-1 abundance in rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56:B449-55.
- Daw CK, Starnes JW, White TP. Muscle atrophy and hypoplasia with aging: impact of training and food restriction. *J Appl Physiol* 1988; 64:2428-32.
- Eddinger TJ, Cassens RG, Moss RL (Mechanical and histochemical characterization of skeletal muscles from senescent rats. *American Journal of Physiology* 1986; 251:C421-C30.
- Zhang Y, Kelsen SG. Effects of aging on diaphragm contractile function in golden hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:1396-401.
- Padykula HA, Herman E. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase *J Histochem Cytochem* 1955; 3:170-95.
- Chillbeck PD, Paterson DH, Cunningham DA, Taylor AW, Noble EG. Muscle capillarization, O<sub>2</sub> diffusion distance, and VO<sub>2</sub> kinetics in old and young individuals *J Appl Physiol* 1997; 82:63-9.
- Smith WN, Dirks A, Sugiura T, Muller S, Scarpace P, Powers SK. Alteration of contractile force and mass in the senescent diaphragm with beta(2)-agonist treatment. *J Appl Physiol*. 2002; 92:941-8.
- Mador MJ, Kufel TJ, Pineda LA. Quadriceps and diaphragmatic function after exhaustive cycle exercise in the healthy elderly. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1760-66.
- Gosselin LE, Betlach M, Vailas AC, Thomas DP. Training-induced alterations in young and senescent rat diaphragm muscle. *J Appl Physiol* 1992; 72:1506-11.
- Philippi M, Sillau AH. Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat. *J Exp Biol*. 1994 Apr;189:1-11.