

Comportamento das reservas de glicogênio no músculo desnervado de ratas tratadas com diferentes doses de estrógeno

Glycogen reserve behavior in denervated muscles of female rats treated with different estrogen doses

Severi MTM¹, Silva CA², Parizotto NA³

Resumo

Objetivo: Avaliar a ação estrogênica sobre o perfil glicogênico do músculo esquelético desnervado de ratas. **Métodos:** Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (n=6): controle; desnervado durante 15 dias; desnervado tratado com estrógeno na concentração de 20µg/peso/dia; desnervado tratado com estrógeno na concentração de 40µg/peso/dia; desnervado tratado com estrógeno na concentração de 80µg/peso/dia e desnervado tratado com estrógeno na concentração de 160µg/peso/dia. Os animais foram tratados com a substância cipionato de estradiol durante 15 dias. As análises realizadas foram: conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e gastrocnêmio vermelho (misto), realizadas por meio do método do fenol sulfúrico, além do peso corporal e do músculo sóleo. A análise estatística incluiu ANOVA e teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados:** A desnervação promoveu redução no conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e misto. Por outro lado, nos grupos tratados com estrógeno, foi observada uma elevação progressiva no conteúdo de glicogênio concomitante com a elevação da dose, restabelecendo as reservas glicogênicas, sendo que a concentração mais efetiva foi a de 160µg/peso/dia, em que foram observadas as melhores respostas químico-metabólicas e a menor perda de peso. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que o estrógeno na concentração de 160µg/peso/dia foi a mais eficiente para minimizar o comprometimento metabólico e pode ser um importante instrumento farmacológico aplicado na prática fisioterapêutica durante a reabilitação.

Palavras-chave: estrógeno; desnervação; músculo; fisioterapia.

Abstract

Objective: To evaluate the action of estrogen on the glycogen profile of denervated skeletal muscle in female rats. **Methods:** The animals were divided into six experimental groups (n=6): control; denervated for 15 days; denervated and treated with estrogen at a concentration of 20µg/weight/day; denervated and treated with estrogen at a concentration of 40µg/weight/day; denervated and treated with estrogen at a concentration of 80µg/weight/day; and denervated and treated with estrogen at a concentration of 160µg/weight/day. The animals were treated with estradiol cypionate for 15 days. The following analyses were carried out: glycogen content of the soleus, white gastrocnemius and red (mixed) gastrocnemius, by means of the phenol-sulfuric acid method as well as body weight and soleus muscle weight. The statistical analysis included ANOVA and the *post-hoc* Tukey test ($p < 0.05$). **Results:** The denervation induced a reduction in glycogen content in the soleus and the white and mixed gastrocnemius muscles. In contrast, there was a progressive elevation of glycogen content concomitant with dose elevation in the groups treated with estrogen, thereby reinstating the glycogen reserves. The most effective concentration was 160µg/weight/day, which showed the best chemometabolic responses and least weight loss. **Conclusion:** These results suggest that estrogen at the concentration of 160 µg/weight/day was the most efficient at minimizing metabolic impairment and that it may be an important pharmacological instrument for physical therapy practice during rehabilitation.

Key words: estrogen; denervation; muscle; physical therapy.

Recebido: 24/06/2008 – Revisado: 19/10/2008 – Aceito: 03/12/2008

¹ Departamento de Fisioterapia, Faculdade Anhanguera de Piracicaba, Piracicaba (SP), Brasil

² Programa de Pós Graduação de Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba (SP), Brasil

³ Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos (SP), Brasil

Correspondência para: Maria Theresa Munhoz Severi, Rua Dona Eugênia, 393, Jardim Europa, CEP 13416-401, Piracicaba (SP), Brasil, e-mail: fisioesa@terra.com.br

Introdução

O músculo esquelético representa de 40 a 45% do peso corpóreo, estando suas ações centradas na capacidade de promover mobilidade ao sistema ósseo, além de exercer participação essencial na manutenção da homeostase glicêmica, devido a sua responsividade à insulina. Assim, a manutenção das condições energéticas ideais depende da integração de vias metabólicas ativadas sequencialmente, permitindo a geração de energia de acordo com a demanda¹.

As relações funcionais entre a integridade da inervação motora e a homeostasia energética das fibras musculares têm sido alvo de diferentes estudos, em especial na desnervação neuromuscular, condição que leva a alterações químico-metabólicas que convergem para a redução tanto na sensibilidade à insulina quanto na cascata sinalizadora pós-receptor, predispondo a hipotrofia^{2,3}.

É sabido que a homeostasia energética das fibras musculares é finamente regulada por hormônios e neurotransmissores. Nesse sentido, na década de 90, foi descrita a presença de receptores de estrógeno nas fibras musculares, sendo constatado que eles possuem atividade sobre o metabolismo energético celular, além de atuar como modulador e regulador da força muscular^{4,5}. Outra relação importante se fundamenta na sinalização estrogênica, uma vez que exibe ação citosólica, ativando cascatas sinalizadoras que modificam a responsividade celular a outros hormônios como, por exemplo, o fator similar à insulina (IGF) e ao hormônio do crescimento (GH), alterando a homeostasia das fibras musculares, interferindo no tamanho da fibra, na composição da miosina e na síntese proteica⁶. No entanto, há divergência quanto às respostas fisiológicas ligadas à ação estrogênica, sendo descrito que, se o estrógeno for administrado pela via oral, a resposta desencadeada é redução na concentração plasmática de IGF-1 seguido de concentrações três vezes maiores de GH após 24h. Por outro lado, se o estrógeno for administrado pela via subcutânea, haverá elevação na concentração plasmática de IGF-1 sem modificar a concentração plasmática de GH, razão pela qual se escolheu essa via de administração na realização deste estudo^{7,8}.

No âmbito da saúde da mulher, os estudos das ações estrogênicas são de singular importância para o entendimento das alterações orgânicas que acompanham mulheres em períodos de redução na produção hormonal, condição em que diversos sintomas se manifestam, como ondas de calor, oscilação do humor, perda de massa óssea e muscular, foco da terapia de reposição hormonal que busca minimizar tais eventos⁹. No que tange aos efeitos indesejados ligados à hormonioterapia com altas doses de estrógeno, tem sido relatado aumento no risco relativo de algumas neoplasias hormônio dependentes endometriais e na mama, bem como aumento no risco de doenças

cardiovasculares, tromboembolismo, mastalgia, elevação no peso corporal e alteração no perfil lipídico¹⁰.

É importante salientar que um recente estudo sugere que o tratamento com estrógeno pode modificar a capacidade antioxidante nas fibras, reduzindo alterações geradas por lesão muscular e acelerando os processos de regeneração, no entanto tem sido observada uma grande variação nas doses administradas, variando de 20µg/peso/dia (baixa dose) até 200µg/peso/dia (alta dose) com ação diferenciada, existindo referência de um efeito estimulante nas baixas doses e um efeito inibitório na presença de altas doses¹¹.

Recentemente foi avaliado o efeito do estrógeno em alta dose (200µg/peso/dia) sobre o conteúdo de glicogênio da musculatura desnervada de ratas e verificou-se melhora na formação dessas reservas¹². Há de se considerar que a importância de se estudar o comportamento das reservas glicogênicas musculares em fêmeas está pautado em dois importantes aspectos, a saber: o primeiro se refere ao índice metabólico uma vez que essa reserva é indicativa de resistência e/ou fadiga¹³, e o outro se fundamenta na escassez de informações sobre o comportamento dessas reservas concomitante à menopausa¹⁴. Por outro lado, não está definido se somente essa alta dose atua melhorando a eficiência na formação das reservas glicogênicas ou se podem ser utilizadas doses menores minimizando os possíveis efeitos colaterais, sendo sugestiva a realização de novos estudos que possam esclarecer e apontar uma dose eficaz para promover um equilíbrio energético e funcional para os músculos submetidos ao desuso.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito de diferentes doses estrogênicas, compreendidas entre 20 e 160µg/peso/dia sobre o conteúdo de glicogênio do músculo esquelético desnervado de ratas.

Materiais e métodos

Foram utilizadas ratas Wistar com peso entre 180 e 200 gramas, com idade variando de três a quatro meses, alimentadas com ração e água *ad libitum*, sendo submetidas a ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro em temperatura controlada de 23±2°C. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6): controle; desnervado; desnervado tratado com estrógeno 20µg/peso/dia; desnervado tratado com estrógeno 40µg/peso/dia; desnervado tratado com estrógeno 80µg/peso/dia e desnervado tratado com estrógeno 160µg/peso/dia. Os animais foram tratados segundo recomendações do Guide for Care Use of Laboratory Animals, sendo o trabalho aprovado pela Comissão de Ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), protocolo CEEA n. 011/2006.

Para a desnervação, as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico na concentração de 50mg/Kg de peso corporal, sendo tricotomizadas na porção posterior da coxa, por onde uma porção de 0,7 cm do nervo ciático foi seccionada e retirada², estando representado na Figura 1. O tratamento com o hormônio cipionato de estradiol foi realizado pela via subcutânea nas concentrações acima mencionadas, no período da manhã, durante 15 dias, a partir do primeiro dia da desnervação.

Após o período experimental, os músculos sóleo, gastrocnêmio porção branca e porção mista foram isolados, retirados e prontamente encaminhados para as avaliações do conteúdo de glicogênio pelo método do fenol sulfúrico¹⁵, além da avaliação do peso do sóleo e corporal das ratas.

Após verificação da homogeneidade das amostras, a análise estatística dos dados foi feita através de ANOVA, seguido do teste de Tukey, sendo que em todos os cálculos foram fixados o nível crítico de 5%.

Resultados

A desnervação promoveu redução nas reservas glicogênicas musculares atingindo 50% no sóleo, 54% no gastrocnêmio branco e 13% no gastrocnêmio porção mista ($p < 0,05$), conforme se pode verificar na Tabela 1. Sequencialmente foram avaliadas as reservas de glicogênio do músculo esquelético desnervado tratado com diferentes concentrações de estrógeno, estando apresentados na mesma tabela, onde se pode observar que as reservas foram significativamente elevadas se comparados ao grupo não tratado, atingindo na concentração estrogênica de 20 μ g/peso/dia valores 76% maiores no sóleo, 204% no gastrocnêmio branco ($p < 0,05$), não sendo observado modificação no músculo gastrocnêmio misto. Por sua vez, no tratamento com estrógeno na concentração de 40 μ g/peso/dia, foi observada elevação de 212% no sóleo, 195% no gastrocnêmio branco e 25% no músculo gastrocnêmio misto ($p < 0,05$). Na concentração de 80 μ g/peso/dia, também foi observada elevação, atingindo 260% no sóleo, 60% no gastrocnêmio branco e 150% no músculo gastrocnêmio misto ($p < 0,05$). Por fim, na concentração de 160 μ g/peso/dia, foi observado que as concentrações glicogênicas foram as maiores e atingiram de forma generalizada todos os músculos, atingindo 260% no sóleo, 282% no gastrocnêmio branco e 218% no músculo gastrocnêmio misto ($p < 0,05$).

Com relação ao peso do músculo sóleo, cabe reiterar que esse músculo foi escolhido devido à maior precisão nos seus limites e isolamento, sendo observado que, frente à desnervação, houve redução de 52,6% no peso, passando de 132 \pm 4mg no controle para 62,5 \pm 3mg no desnervado. Por outro lado,

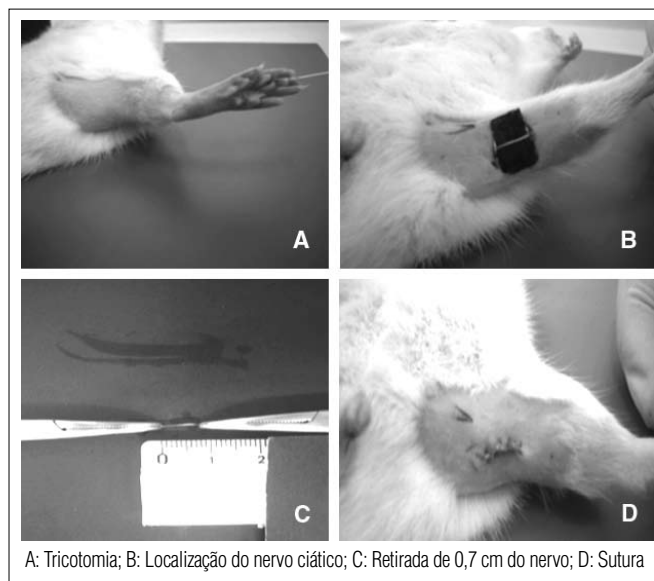


Figura 1. Procedimento de desnervação.

Tabela 1. Concentração muscular de glicogênio (mg/100mg) de ratas dos grupos controle, desnervado (D) e tratados com diferentes concentrações de estrógeno (E). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6.

	Sóleo	Gastrocnêmio porção branca	Gastrocnêmio porção mista
Controle	0,49 \pm 0,05	0,50 \pm 0,04	0,37 \pm 0,04
D	0,25 \pm 0,04*	0,23 \pm 0,02*	0,32 \pm 0,04*
D+E 20 μ g/peso/dia	0,44 \pm 0,05#	0,47 \pm 0,05#	0,32 \pm 0,03
D+E 40 μ g/peso/dia	0,53 \pm 0,05#	0,45 \pm 0,05#	0,40 \pm 0,02#
D+E 80 μ g/peso/dia	0,65 \pm 0,09#	0,60 \pm 0,06#	0,48 \pm 0,03#
D+E 160 μ g/peso/dia	0,65 \pm 0,08#	0,65 \pm 0,08*#	0,70 \pm 0,04*# \approx

Desnervado (D); Estrógeno (E); * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo desnervado, $\approx p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 80 μ g/peso/dia.

ressalta-se que, somente no grupo tratado com estrógeno 160 μ g/peso/dia, a perda de peso foi menor se comparada ao não tratado, atingindo valores 41% menores que o controle, ou seja, apresentando 77,8 \pm 3mg no desnervado tratado. Nesse aspecto, o grupo tratado apresentou o peso 24% maior do que o não tratado ($p < 0,05$).

Discussão

Ao se avaliar o conteúdo de glicogênio dos músculos desnervados foi verificada uma expressiva redução das reservas com alta intensidade nos músculos sóleo e gastrocnêmio porção branca, compostos de fibras tipo I e II, respectivamente, e com menor intensidade no gastrocnêmio porção mista. Esses dados acompanham a hipótese de haver uma forte correlação funcional na tríade junção neuromuscular/perfil energético/sensibilidade insulínica. Assim, concomitante à secção do

nervo, rompe-se a integração funcional mantenedora da homeostasia energética e traz como reflexo a redução na translocação da isoforma de transportadores de glicose GLUT 4 de reservatórios citosólicos em direção à membrana, elevação na atividade das enzimas envolvidas na glicólise, aumento na concentração de AMPc da proteína quinase dependente de AMPc, redução da atividade da enzima glicogênio sintetase e elevação na atividade da enzima glicogênio fosforilase, comprometendo o equilíbrio energético, predispondo ao quadro de resistência à insulina^{16,17}.

Por sua vez, ao se avaliar o peso do músculo sóleo desnervado, verificou-se que somente aquele submetido ao tratamento com o estrógeno 160µg/peso/dia apresentou uma efetiva diminuição na perda de peso e pode indicar que a expressão da sinalização estrogênica interfere nos processos ligados à proteólise que acompanham a hipotrofia^{18,19}.

No que tange ao efeito das diferentes doses do estradiol, iniciou-se avaliando as concentrações de 20 e 40µg/peso/dia que são consideradas como doses baixas e com pouca responsividade em diversos sistemas biológicos^{10,20,21}. Nesta análise, foi verificado que houve uma significativa elevação nas reservas glicogênicas, porém com menor expressão na musculatura mista do gastrocnêmio, assim, demonstrou-se que as microdoses, apesar de manifestarem eficiência na ativação de parâmetros metabólicos, não o fazem de forma homogênea, podendo indicar uma tríade de ação que depende do tipo de fibra, da concentração hormonal e do padrão metabólico vigente. É importante salientar que, com relação à força muscular, há estudos que sugerem não haver diferença frente à variação na concentração circulante de estrógeno^{22,23}.

Por sua vez, quando o estrógeno foi administrado na concentração de 80µg/peso/dia também houve uma expressiva e generalizada elevação nas reservas musculares de glicogênio, induzindo a aquisição de um novo padrão que, nesta concentração, contempla a musculatura mista do gastrocnêmio. Por fim, ao se avaliar o tratamento com estrógeno na concentração de 160µg/peso/dia, verificou-se elevação significativa nas reservas glicogênicas, atingindo uma proporcionalidade de

ação que contempla os diferentes tipos de fibras musculares, estabelecendo, com isso, um novo e melhor padrão energético nas fibras desnervadas. Os resultados demonstraram que o gastrocnêmio porção branca foi o músculo que exibiu as maiores concentrações glicogênicas. Nesse sentido, sabe-se que esse tipo de fibra apresenta as maiores populações de receptores de estrógeno, sendo sítio de ação da molécula¹⁴. Essa observação se reveste de grande importância, pois tem sido relatado que as fibras tipo II são reduzidas em grande quantidade na menopausa e podem ser preservadas concomitante à reposição hormonal¹⁴.

Em um recente estudo de Severi¹², foi demonstrado que o tratamento com estrógeno (200µg/peso/dia) também foi eficiente em minimizar a proliferação de tecido conjuntivo, mantendo as fibras desnervadas em melhores condições fisiológicas, reiterando, assim, a importância do estrógeno para o equilíbrio das funções histofisiológicas do tecido muscular. Possivelmente, os benefícios ora descritos no tecido muscular estejam refletindo a modulação estrogênica que atua na interface entre as vias genômicas e não genômicas que perfazem os sítios da ação hormonal^{22,23}.

Por fim, este estudo mostra que o estrógeno administrado em uma dose 20% menor que a utilizada no estudo realizado por Severi¹² promoveu benefícios na homeostasia energética das fibras musculares desnervadas e, possivelmente, por se tratar de uma dose menor, haja minimização na ocorrência dos efeitos colaterais.

Conclusão

Os dados mostram que quando se trata de promover melhora ou restabelecimento nas condições energéticas das fibras musculares desnervadas, a melhor concentração estrogênica foi 160µg/peso/dia, e merece uma atenção especial, pois pode ser uma importante ferramenta farmacológica utilizada/aplicada na interface da reabilitação no campo da fisioterapia.

Referências bibliográficas

1. Wallberg-Henriksson H. Glucose transport in skeletal muscle. Influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. *Acta Physiologica Scand.* 1987;131(Suppl 564):1-80.
2. Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB, et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol.* 1992;131(4):1821-5.
3. Magnusson C, Svensson A, Christerson U, Tagerud S. Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. *Eur J Neurosci.* 2005;21(2):577-80.
4. Skelton DA, Phillips SK, Bruce SA, Naylor CH, Wodege RC. Hormone replacement therapy increases isometric muscle strength of adductor pollicis in post-menopausal women. *Clin Sci (Lond).* 1999;96(4):357-64.

5. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Shütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835-9.
6. Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguère V, Kelly DP. Estrogen-related receptor α directs peroxisome proliferator-activated receptor α signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 2004;24(20):9079-91.
7. Ho KK, O'Sullivan AJ, Wolthers T, Leung KC. Metabolic effects of oestrogens: impact of the route of administration. *Ann Endocrinol*. 2003;64(2):170-7.
8. Huang DS, O'Sullivan AJ. Short-term oral oestrogen therapy dissociates the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis without altering energy metabolism in premenopausal women. *Growth Horm IGF Res*. 2008;3:125-30.
9. Kuiper G, Gustafsson J. The novel estrogen receptor-beta-subtype potential role in the cell-and-promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *Fed Eur Biochem Soc Lett*. 1996;410:87-90.
10. Mosquete R, Gomes MPCL, Simões RS, Haidar MA, Simões MJ, Soares Jr JM, et al. Efeitos da isoflavona sobre o miométrio de ratas adultas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28(4):227-31.
11. Feng X, Li G, Wang S. Effects of estrogen on gastrocnemius muscle strain injury and regeneration in females rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25(11):1489-94.
12. Severi MTM. O efeito do cipionato de estradiol na limitação funcional induzida pela desnervação neuromuscular em ratas [dissertação]. Piracicaba: Universidade Metodista de Piracicaba; 2007.
13. dos Santos MG, Dezan VH, Sarraf TA. Bases metabólicas da fadiga muscular aguda. *Rev Bras Ciên Mov*. 2003;11(1):7-12.
14. Brown M. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Adv Physiol Educ*. 2008;32(2):120-6.
15. Lo S, Rousseau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970;28(2):234-6.
16. Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, Baldwin KM. Atrophy responses to muscle inactivate: II molecular markers of protein deficits. *J Appl Physiol*. 2003;95(2):791-802.
17. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Ibebunjo C, Martyn JA. Long-term denervation impairs insulin receptor substrate 1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. *Metabolism*. 2001;50(2):216-22.
18. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(6):E1235-41.
19. Nunes WMS, Mello MAR. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. *Braz Arch Biol Technol*. 2005;48(4):541-48.
20. Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, et al. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*. 2002;83(pt11):2897-905.
21. Di Prampero PE, Narici MV. Muscles in microgravity: from fibres to human motion. *J Biomech*. 2003;36(3):403-12.
22. Gonzales C, Alonso A, Grueso NA, Díaz F, Esteban MM, Fernández S. Role of 17beta-estradiol administration on insulin sensitivity in the rat: implications for the insulin receptor. *Steroids*. 2002;67(13-14):993-1005.
23. Wiik A, Ekman M, Morgan G, Johansson O, Jansson E, Esbjornsson M. Oestrogen receptor beta is present in both muscle fibers and endothelial cells within human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol*. 2005;124(2):161-5.