

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Efeito do alongamento contínuo e intermitente nas adaptações do músculo  
sóleo de rato

Giovanna Distefano

2007

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GIOVANNA DISTEFANO

# EFEITO DO ALONGAMENTO CONTÍNUO E INTERMITENTE NAS ADAPTAÇÕES DO MÚSCULO SÓLEO DE RATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor: Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Balisardo Minamoto

PIRACICABA  
2007

## Ficha Catalográfica

Distefano, Giovanna

Efeito do alongamento contínuo e intermitente nas adaptações do músculo sóleo de rato. Piracicaba, 2007.

88f

Profa. Dra. Viviane Balisardo Minamoto

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós- Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

1. Exercícios de alongamento muscular 2. Ratos 3. Sarcômeros 4. Tecido conjuntivo 5. Atrofia I. Minamoto, Viviane Balisardo. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III. Alongamento contínuo e intermitente nas adaptações musculares do músculo sóleo de rato.

Dedico este trabalho aos meus pais, José Roberto e Miriam, e ao meu marido Ricardo por todo apoio e carinho!

## AGRADECIMENTOS

Meu enorme agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e particularmente:

Aos professores do mestrado por todo conhecimento transmitido. Em especial a professora Rosana por nos ajudar e acolher enquanto a Vivi esteve ausente e a professora Delaine por tudo que me ensinou durante a iniciação científica e ensina até hoje.

A professora Maria Imaculada por todo auxílio e atenção na realização da análise estatística.

Aos professores da banca examinadora Delaine, Fábio, Jamilson e Maria Luiza. Muito obrigada por aceitarem o convite. As ricas contribuições amadureceram e completaram meu trabalho.

Aos funcionários Ana, Patrícia, Mel, Darci, Cris e Miriam por todo o auxílio e atenção, sempre me ajudando nos momentos de sufoco.

As minhas companheiras de mestrado Lari, Lú e Sibebe pela companhia e auxílio, as meninas da iniciação científica Thaysa e Marcela, pela dedicação e empenho, e principalmente ao meu amigo Fábio, sem você este trabalho não seria o mesmo, obrigada pelo auxílio, sugestões, alongamento aos finais de semana... Enfim, esse trabalho é um pouco seu também.

A minha orientadora Viviane por todo conhecimento transmitido nesses cinco anos de laboratório, por me iniciar na pesquisa científica e ensinar cada dia mais. Pela amizade e incentivo, o meu eterno agradecimento.

Aos meus pais, José Roberto e Miriam por permitirem a realização de um sonho e acreditarem em mim. Obrigada por todo incentivo, carinho, confiança e por entenderem a minha ausência.

Aos meus irmãos Gabi, Gio e Bé, que eu tanto amo, por toda alegria e incentivo.

Ao meu marido Ri por seu amor dedicado, companheirismo, sugestões, pelas inúmeras conversas sobre pesquisa e principalmente paciência nos momentos de ausência.

A Deus, por me guiar e proteger

## RESUMO

O alongamento é um recurso freqüentemente utilizado no esporte e reabilitação. No entanto, algumas questões a seu respeito ainda não são completamente esclarecidas, tais como qual a melhor intensidade, freqüência, duração e tipo de alongamento a ser empregado para obtenção de melhores resultados. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar e comparar os efeitos do alongamento contínuo e intermitente nas adaptações do músculo sóleo, normal e encurtado, de rato. Foram utilizados 45 ratos machos *Wistar* ( $240 \pm 50$ g) divididos em seis grupos: Controle (C); Imobilizado (I); Imobilizado + alongamento estático contínuo (IAC) ou intermitente (IAI); Alongamento estático contínuo (AC) ou intermitente (AI). Para o procedimento de imobilização os animais foram anestesiados e a pata posterior esquerda foi posicionada em máxima flexão plantar, durante 21 dias. As sessões de alongamento tiveram início no 15º dia, e foram realizadas uma vez ao dia, durante 40 minutos, por 7 dias consecutivos. No alongamento contínuo o tornozelo foi mantido manualmente em máxima dorsiflexão por 40 minutos. Já no alongamento estático intermitente, a articulação do tornozelo foi mantida manualmente em máxima dorsiflexão durante 60 segundos, com intervalo de 30 segundos entre as repetições, também durante 40 minutos. Nos grupos imobilizados e posteriormente alongados, a órtese era removida para a aplicação do alongamento, sendo posteriormente recolocada. No 22º dia do experimento os animais foram sacrificados e as variáveis massa corporal e muscular, amplitude de movimento (ADM), adaptações de sarcômero, área de secção transversa (AST) e densidade de tecido conjuntivo (TC) foram analisadas. Os grupos AC e AI apresentaram aumento da massa corporal, enquanto os grupos I, IAC e IAI apresentaram diminuição da mesma, sendo todos os grupos diferentes do C ( $p \leq 0.000009$ ). No entanto, os grupos IAC e IAI apresentaram diminuição significativamente maior do que os animais apenas imobilizados ( $p \leq 0.007$ ). Nos grupos I, IAC e IAI houve redução da massa muscular absoluta ( $p \leq 0.05$ ) e relativa ( $p \leq 0.03$ ), da ADM final ( $p \leq 0.05$ ) e aumento da densidade de TC ( $p \leq 0,05$ ) quando comparados ao grupo C. Além disso, apenas o grupo I apresentou redução do comprimento muscular ( $p \leq 0.0002$ ) e do número de sarcômeros quando comparado ao C ( $p \leq 0.05$ ). Para todas essas variáveis não foram observadas diferenças significativas entre os grupos contínuo e intermitente. Em relação a AST houve diminuição desta variável nos grupos I e IAI quando comparado aos demais grupos ( $p \leq 0.000007$ ). Dessa forma, observou-se que no músculo encurtado os protocolos contínuo e intermitente levaram a respostas distintas somente para a variável AST, sendo apenas o protocolo contínuo eficaz para reverter a atrofia da fibra muscular. Além disso, os protocolos utilizados, tanto contínuo como intermitente, aplicados em músculos normais não foram eficazes para provocar adaptações musculares.

**Palavras Chaves:** Exercícios de alongamento muscular, sarcômeros, tecido conjuntivo, atrofia

## ABSTRACT

Stretching is an often technique used for sports and rehabilitation. However, some concerns are still not understood, such as if there is some different muscular response after the use of different stretching protocols. The aim of this study was to evaluate and to compare the effects of continuous and intermittent stretching protocols on shortened and normal soleus rat muscle adaptation. Forty-five male Wistar rats ( $240\pm 50$ g) were divided into 6 groups: control (C), immobilized (I); immobilized + continuous stretching (ICS); immobilized + intermittent stretching (IIS); continuous stretching (CS) and intermittent stretching (IS). For the immobilization procedure the animals were anaesthetized and the left hindlimb was positioned in maximal plantar flexion, during 21 days, using an immobilization device. The stretching sessions began on the 15<sup>o</sup> day and they were performed once per day, during 40 minutes and for 7 consecutive days. For continuous stretching protocol, the animals had the ankle manually kept in maximal dorsiflexion during 40 minutes. In the intermittent stretching protocol, the ankle joint was manually kept in maximal dorsiflexion for 60 seconds with a 30s interval between each 60s period, in a total of 40 min. In both immobilized and stretched groups, the immobilization device was removed for stretching application and after that, the hindlimb was immobilized again. On the 22<sup>nd</sup> day of the experiment the animals were euthanized and the following variables were evaluated: body and muscle mass, range of movement (ROM), sarcomere adaptation, cross sectional area (CSA) and area density of connective tissue (TC). While the groups CS and IS showed an increase in the body mass, the I, ICS and IIS groups showed a decrease in this variable, and all these groups were different from the C ( $p\leq 0.000009$ ). However, the ICS and IIS groups had a more evident decrease in the body mass when compared to I group ( $p\leq 0.007$ ). In the groups I, ICS and IIS there was a decrease in both absolute ( $p\leq 0.05$ ) and relative ( $p\leq 0.03$ ) muscle mass, final ROM ( $p\leq 0.05$ ) and increase in the intramuscular CT ( $p\leq 0.05$ ) when compared to the C group. Besides, only the group I showed reduction in the muscle length ( $p\leq 0.0002$ ) and in the number of sarcomere ( $p\leq 0.05$ ) related to the control values. For all these variables, it was not found significant difference between the ICS and IIS groups. Related to the CSA there was a decrease in this variable in both I and IIS groups when compared to the others ( $p\leq 0.000007$ ). Then, it could be noted that both stretching protocols, continuous and intermittent, when applied on the shortened muscle, did promote different muscle adaptation only in the CSA, and only the continuous stretching was efficient to treat the muscle fiber atrophy. Besides, the application of continuous and intermittent stretching on a normal muscle was not able to promote muscular adaptation.

**Key Words:** Stretching muscle exercise, sarcomere, connective tissue, atrophy

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 Flexibilidade	12
2.2 Efeitos da imobilização	16
2.3 Alongamento	21
2.4 Viscoelasticidade	26
3 OBJETIVO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Amostra	31
4.2 Grupos experimentais	31
4.3 Procedimentos para a imobilização	33
4.4 Alongamento	33
4.5 Análise da massa corporal	35
4.6 Análise da massa muscular absoluta e relativa	35
4.7 Amplitude de movimento (ADM)	35
4.8 Processamento dos músculos	36
4.9 Análise morfométrica	37
4.10 Análise da adaptação de sarcômeros	39
4.11 Análise estatística	40
5 RESULTADOS	
5.1 Análise morfológica	41
5.2 Variação da massa corporal	43
5.3 Massa muscular absoluta e relativa	44
5.4 Amplitude de movimento	46
5.5 Comprimento muscular	48
5.6 Número de sarcômeros em série	49
5.7 Extensão do sarcômero	50
5.8 Área de secção transversa	51
5.9 Densidade de área de tecido conjuntivo intramuscular	52



6 DISCUSSÃO	
6.1 Massa corporal e muscular	53
6.2 Adaptação de sarcômeros	55
6.3 Área de secção transversa	58
6.4 Densidade de área de tecido conjuntivo intramuscular	62
6.5 Amplitude de movimento	65
6.6 Protocolo experimental	68
7 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

## 1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é capaz de alterar suas propriedades estruturais e funcionais, adaptando-se às diferentes condições impostas a ele (Baldwin e Haddad, 2002). Esta adaptação pode ser observada após períodos de imobilização em posição encurtada, quando o músculo responde com diminuição da síntese protéica e do número de sarcômeros em série, atrofia da fibra muscular e proliferação de tecido conjuntivo intramuscular desorganizado, levando à redução da amplitude de movimento articular (Tabary et al., 1972; Williams e Goldspink, 1978; Williams, 1990; Coutinho et al., 2004).

O alongamento é um recurso freqüentemente utilizado com o intuito de prevenir ou reverter os efeitos deletérios da imobilização, pois o mesmo atua nas fibras musculares e tecido conjuntivo intramuscular, o que promove aumento na extensibilidade do músculo (Deyne, 2001).

Porém, apesar de existirem diversos estudos sobre alongamento (Williams, 1988; Williams, 1990; Coutinho et al., 2004) e sua utilização ser freqüente na reabilitação e nas atividades desportivas, muitas questões ainda não são completamente esclarecidas, tais como qual a melhor intensidade, freqüência, duração e tipo de alongamento a ser empregado para obtenção de melhores resultados.

Dentre os tipos de alongamento utilizados encontra-se o estático, que é caracterizado por provocar aumento do comprimento muscular até um ponto tolerável, com manutenção desta posição por um período de tempo, sendo considerado por muitos autores o método mais utilizado (Bandy e Irion, 1994; Rosário, Marques e Maluf, 2004).

O alongamento estático pode ser empregado com diferentes durações, frequência e número de repetições. Além disso, pode ser caracterizado como contínuo, quando é mantido constante por um longo período, ou apresentar intervalos durante sua aplicação, sendo caracterizado como um estático intermitente (Alter, 1999).

Apesar da comprovada eficácia do alongamento estático para o músculo esquelético, o efeito dos intervalos entre as séries de alongamento ainda não é conhecido. Não está estabelecido se o alongamento contínuo promove o mesmo resultado que o intermitente. No entanto, acredita-se que breves períodos de intervalo possam gerar diferentes respostas adaptativas (Deyne, 2001).

Diversos trabalhos realizados com humanos mostram resultados benéficos com relação aos dois tipos de alongamento estático, o contínuo e o intermitente (Starring et al., 1988; Webright, Randolph e Perrin, 1997; Bandy, Irion e Briggler, 1998; Roberts e Wilson, 1999). Entretanto, todos esses estudos avaliaram a resposta muscular apenas por meio da amplitude de movimento, mensurada pela goniometria, que consiste em uma medida subjetiva da condição muscular. Sendo assim, a comparação dos efeitos dos dois tipos de alongamento na morfologia e adaptação de sarcômeros do músculo esquelético não está, até o momento, estabelecida.

Com base no exposto, o presente estudo teve como enfoque responder uma das várias questões relacionadas ao alongamento: Existe diferença na adaptação muscular quando o músculo é submetido a um protocolo de alongamento contínuo e intermitente?

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Flexibilidade**

A flexibilidade é caracterizada por alguns autores como sendo a habilidade de mover uma única articulação ou uma série de articulações de maneira suave e confortável por meio da amplitude de movimento irrestrita e sem dor (Vesco, 1990; Prentice, 1999). Neste contexto, o comprimento do músculo, a integridade articular e a extensibilidade dos tecidos moles periarticulares são fatores que a determinam (Kisner e Colby, 2005).

Para Chandler et al. (1990) a flexibilidade consiste na capacidade de mover a articulação através de uma amplitude de movimento normal, sem estresse excessivo para a unidade músculo-tendínea. Outros autores a definem simplesmente como a máxima amplitude de movimento em uma articulação ou grupo de articulações (Corbin e Noble, 1980; Anderson e Burke, 1991; Alter, 1999).

O termo flexibilidade dinâmica é utilizado para caracterizar a amplitude de movimento ativa de uma articulação, enquanto que a flexibilidade passiva consiste no grau em que uma articulação pode ser movida passivamente por meio da amplitude de movimento disponível. A flexibilidade passiva é um pré-requisito da flexibilidade dinâmica, porém, não uma garantia dela (Kisner e Colby, 2005).

No entanto, alguns autores utilizam o termo flexibilidade para referir-se ao músculo (Gadjosik e Bohannon, 1987; Mchugh et al., 1992; Gadjosik, 1995; Feland et al., 2001), sendo a palavra utilizada com o intuito de mencionar a extensibilidade muscular. Alguns autores citam a flexibilidade muscular passiva

como sendo a relação comprimento-tensão existente quando o músculo é passivamente alongado (Gajdosik e Bohannon, 1987; Gajdosik, 1995).

Como citado anteriormente, a flexibilidade só é possível, dentre outros fatores, devido ao músculo apresentar extensibilidade passiva, ou seja, ser capaz de aumentar seu comprimento com ou sem ativação muscular. Trata-se de um componente importante para a manutenção da função, já que contribui para a amplitude de movimento e, dessa forma, é alvo freqüente a ser atingido na reabilitação e esporte (Gajdosik, 2001).

Diversos fatores podem influenciar a extensibilidade passiva, tais como: pontes cruzadas de actina e miosina (Proske e Morgan, 1999); filamentos não contráteis de titina (Lieber, 2002) e desmina (Gajdosik, 2001), e tecido conjuntivo intramuscular, principalmente o perimísio (Borg e Caulfield, 1980; Purslow, 1989).

A influência da actina e miosina na extensibilidade passiva pode ser explicada pelo fato das mesmas permanecerem unidas por meio de pontes cruzadas (Hill, 1968). Sabe-se que os filamentos de actina e miosina estão constantemente unidos, porém, o estado de ligação entre eles pode variar de um estado de ligação forte, que ocorre durante a contração muscular, ou fraco, quando o músculo está relaxado. Este estado de ligação é fundamental para o entendimento da tensão muscular desenvolvida. Sendo assim, observam-se respostas distintas estando o músculo em contração ou em diferentes comprimentos de sarcômero (Proske e Morgan, 1999).

Além disso, estudos prévios (Huxley et al., 1994; Takezawa, Sugimoto e Wakabayashi, 1998) sugerem que os filamentos de actina e miosina apresentam propriedades elásticas reduzidas que contribuem ainda mais para a

limitação da extensibilidade. Porém, pesquisas ainda são necessárias para a compreensão da influência dessas proteínas na resistência passiva ao alongamento.

Outro fator importante para manutenção da extensibilidade é a influência de filamentos conectivos não contráteis. Um desses filamentos é a titina, uma proteína presente no músculo esquelético que se estende de uma linha Z até o centro do sarcômero. A titina pode ser dividida em duas regiões: uma na banda I e outra na banda A, sendo a primeira facilmente alongada, enquanto que, a segunda comporta-se de forma rígida durante o alongamento (Lieber, 2002). Sendo assim, a titina é responsável por impedir aumento excessivo no comprimento muscular, além de manter o alinhamento e manutenção da miosina no centro do sarcômero (Horowitz et al., 1986; Alter, 1999).

Diversos estudos buscam entender de que forma a titina influencia a tensão passiva. Em estudo realizado por Wang et al. (1991) observou-se que o comprimento da titina consiste em fator importante para determinar quando os sarcômeros irão desenvolver tensão de alongamento e onde o sarcômero irá ceder sob estresse. Além disso, os autores observaram que os grupos musculares expressam diferentes isoformas de titina e, sendo assim, apresentam curvas de estresse-tensão distintas.

Um segundo filamento conectivo que merece destaque é a desmina, a qual consiste em abundante proteína do citoesqueleto muscular, que exerce papel importante na organização da matriz miofibrilar (Shah et al., 2002). Sua importante função pode ser explicada pelas ligações que possui com diferentes locais da fibra: conecta a miofibrila à mitocôndria, ao núcleo, sarcolema e costâmeros, além de unir as linhas Z tanto de forma radial como longitudinal

(Shah et al., 2004). Além disso, apresenta abundante distribuição na junção miotendínea (Tidball, 1992). Devido a sua distribuição tanto radial como longitudinal, quando o sarcômero aumenta o seu comprimento a desmina também contribui como resistência passiva ao alongamento (Gajdosik, 2001).

Sabendo da importância da desmina para a estrutura miofibrilar, Shah et al. (2001) avaliaram a influência desta proteína na adaptação músculo esquelética durante o período de imobilização de quatro semanas e observaram que a presença ou ausência da desmina não influenciou na redução do número de sarcômeros em série, nem na atrofia muscular. Sendo assim, os autores concluíram que a presença da desmina não influenciou na resposta muscular à imobilização.

Além das proteínas contráteis e não contráteis, um terceiro fator capaz de limitar a extensibilidade muscular consiste no tecido conjuntivo intramuscular. Este é formado por grande quantidade de fibras colágenas, as quais apresentam grande resistência ao estímulo de tração (Alter, 1999).

O tecido conjuntivo intramuscular se distribui em três camadas ao longo do músculo, sendo: epimísio, perimísio e endomísio. O endomísio consiste numa densa rede de fibras colágenas que circundam a fibra muscular individualmente, o perimísio envolve um conjunto de fibras musculares, ou fascículo, enquanto que o epimísio circunda o músculo como um todo (Borg e Caulfield, 1980). De maneira geral, o endomísio e perimísio apresentam fibras em diferentes direções: longitudinal, perpendicular, além de fibras que se ligam a vasos e nervos (Jarvinen et al., 2002). Embora os três tipos de tecido conjuntivo contribuam para a resistência passiva, o perimísio é considerado o maior

responsável pela limitação da extensibilidade (Borg e Caulfield, 1980; Purslow, 1989).

Considerando que todos os elementos citados acima contribuem para a resistência passiva, e que todos eles fazem parte do tecido muscular pode-se dizer que a quantidade de massa muscular também é fator relacionado a limitação da extensibilidade muscular (Gajdosik, 2001).

Além disso, a extensibilidade passiva, e conseqüentemente a flexibilidade, pode estar reduzida em situações como inatividade por imobilização (Tabary et al., 1972), controle muscular inadequado (Alter, 1999), sedentarismo e envelhecimento (Wilmore, 1991), sendo necessária intervenção terapêutica para manutenção das características musculares adequadas (Gajdosik, 2001).

## **2.2 Efeitos da imobilização**

Sabe-se que o músculo esquelético possui extraordinária habilidade de reestruturar-se metabólica e estruturalmente em resposta a mudanças ambientais (Lieber, 2002), sendo esta adaptação específica ao estímulo recebido. Assim, a resposta muscular decorrente da imobilização é dependente da posição que músculo foi imobilizado, sendo a mesma diferenciada após imobilização em posições articulares distintas.

Ao ser imobilizado em posição de alongamento o músculo responde com aumento da síntese protéica e do número de sarcômeros em série, diminuição do comprimento do sarcômero, podendo apresentar ainda presença moderada ou ausência de atrofia e pouca ou nenhuma mudança significativa no



tecido conjuntivo (Tabary et al., 1972; Goldspink, 1977; Williams e Goldspink, 1978; Williams et al., 1988).

Já ao ser imobilizado em posição de encurtamento o músculo responde com redução da síntese protéica, da força muscular e do número de sarcômeros em série, aumento do comprimento do sarcômero, atrofia das fibras musculares e proliferação de tecido conjuntivo desorganizado, com conseqüente perda da extensibilidade muscular (Tabary et al., 1972; Williams et al., 1988; Williams, 1990; Gamrin et al., 1998; Gomes et al., 2004).

Quando a imobilização é removida, os músculos, tanto aqueles mantidos em posição de alongamento como aqueles mantidos em encurtamento, são capazes de se readaptar para retornar ao número de sarcômeros e comprimento muscular originais (Williams e Goldspink, 1971).

Em estudo realizado em 1972 por Tabary e colaboradores, com o intuito de avaliar a resposta muscular à imobilização em diferentes posições articulares, observou-se que a imobilização do sóleo por quatro semanas em posição de alongamento resultou em aumento de 19% do número de sarcômeros em série enquanto que a imobilização por um mesmo período em posição de encurtamento resultou em diminuição de 40% do número de sarcômeros e aumento na resistência ao alongamento passivo. Os autores concluíram que o músculo é mais susceptível às alterações decorrentes da imobilização em posição encurtada que alongada. Além disso, pôde-se observar que a adição de sarcômeros foi acompanhada de diminuição no seu comprimento, enquanto que a redução do número de sarcômeros em série resultou no aumento do comprimento dos sarcômeros restantes.

A alteração no comprimento do sarcômero observada sempre que o músculo aumenta ou diminui o número de sarcômeros em série ocorre com o intuito de ajustar o tamanho do sarcômero para que o músculo consiga desenvolver sua máxima tensão no novo comprimento da fibra (Williams e Goldspink, 1978; Shah et al. 2001; Lieber, 2002).

No mesmo trabalho realizado por Tabary et al. (1972) os autores avaliaram se após quatro semanas da retirada das órteses os músculos que permaneceram alongados ou encurtados ainda mantinham as características adquiridas. Os resultados mostraram que num período de quatro semanas os músculos são capazes de recuperar sua extensibilidade e número de sarcômeros em série.

Em estudo realizado alguns anos depois, por Williams e Goldspink (1984), com o intuito de analisar o efeito da imobilização em posição de encurtamento do músculo sóleo, os autores observaram considerável aumento na concentração de colágeno logo no período inicial da imobilização. Após dois dias de inatividade foi possível observar aumento na densidade de área do perimísio, o qual é considerado um dos maiores determinantes da extensibilidade, sendo que esta alteração ocorreu antes mesmo da perda do número de sarcômeros em série. Após uma semana já foi possível observar grande aumento na densidade de área do endomísio, devido à atrofia das fibras musculares, e após duas semanas, considerável alteração na disposição das fibras colágenas.

Algum tempo depois, Williams et al. (1988) ao avaliarem o efeito da imobilização por sete dias, observaram significativa redução no número de sarcômeros em série e aumento de tecido conjuntivo no músculo sóleo quando imobilizado em posição de encurtamento. Além disso, pôde-se observar que

quando a imobilização era associada a eletroestimulação a mesma prevenia a proliferação de tecido conjuntivo, mostrando a influência da atividade contrátil para manter a densidade de área de tecido conjuntivo adequada.

No mesmo estudo, ao avaliarem a resposta do sóleo à inatividade em posição alongada, observou-se aumento do número de sarcômeros em série, porém, nenhuma alteração na quantidade de tecido conjuntivo.

Segundo Tabary et al. (1972), o aumento de tecido conjuntivo no músculo imobilizado em posição de encurtamento tem como objetivo prevenir o estiramento ou alongamento excessivo. Essas alterações não são observadas no músculo imobilizado em posição alongada, pois o mesmo não é susceptível ao estiramento, uma vez que já se encontra em posição de grande alongamento.

Em outro estudo realizado por Williams (1988) foi avaliado o efeito de dez dias de imobilização do sóleo em posição de encurtamento. Após o período experimental, o autor observou que o grupo imobilizado apresentou grande redução da amplitude de movimento articular (dorsiflexão de  $96^\circ$  *versus*  $163^\circ$  observada no grupo controle), além de aumento na densidade de área do tecido conjuntivo e diminuição do número de sarcômeros em série. Além disso, observou-se também que após secção do tendão do músculo sóleo a amplitude de movimento ainda continuava diminuída, mostrando que a rigidez apresentada após o período de imobilização não era devido apenas a alterações nas propriedades musculares, mas também a alterações da própria articulação.

Dentre as estruturas articulares que são danificadas durante a imobilização pode-se citar a cartilagem articular. Sabe-se que sua estrutura e função são influenciadas por estímulos mecânicos. Sendo assim, ao ser submetida a imobilização com o tornozelo em máxima flexão plantar, a cartilagem

articular do tornozelo responde com alterações em suas propriedades, tais como redução em sua espessura e no conteúdo de proteoglicanas, com conseqüente diminuição na amplitude de movimento (Renner et al., 2006).

Outra alteração observada após período de imobilização em posição de encurtamento é a redução da força muscular. Em estudo realizado com humanos pôde-se observar diminuição de 16% da síntese protéica e redução de 17% do pico de força após período de dez dias de imobilização (Gamrin et al., 1998).

Em 2003, Ahtikoski e colaboradores, observaram redução da massa muscular do sóleo de rato sendo de 20% após três dias de imobilização em posição de encurtamento e 34% após sete dias na mesma situação. Observaram também que ao ser imobilizado em posição de alongamento, o músculo apresentou redução de 17% da massa muscular após três dias e de 25% após sete dias. Os autores concluíram que a perda da massa muscular está relacionada ao tempo de imobilização, e que a posição de encurtamento é mais susceptível a esta perda.

Em estudo realizado por Coutinho et al. (2004), pôde-se observar redução média de 19% do comprimento muscular e de 23% do número de sarcômeros em série após três semanas de imobilização em posição de encurtamento. Este fato foi acompanhado de aumento do comprimento do sarcômero e redução de 37% da área de secção transversa das fibras musculares, o que se traduz em grande atrofia muscular.

A partir dos estudos citados, pode-se relatar que o tecido muscular apresenta alta plasticidade em alterar sua conformação, uma vez que mesmo em

posições distintas, ou diferentes tempos de imobilização, o tecido muscular se adaptou ao estímulo fornecido.

### **2.3 Alongamento**

Apesar de existirem inúmeros estudos sobre alongamento (Williams, 1988; Williams, 1990; Coutinho et al., 2004), há poucos trabalhos conclusivos. Muitos autores discordam entre si na tentativa de estabelecer parâmetros, sendo muitas vezes difícil escolher na prática clínica o protocolo de alongamento mais apropriado.

Dentre os tipos de alongamento realizados tem-se o estático, o balístico, o alongamento obtido por meio da contração muscular excêntrica e a facilitação neuromuscular proprioceptiva.

O alongamento estático consiste no aumento do comprimento muscular até um ponto tolerável e manutenção desta posição por um período de tempo, podendo ou não ser repetido. Alguns autores consideram este tipo de alongamento como sendo o que apresenta menor risco de lesões, sendo, dessa forma, o mais usado (Beaulieu, 1981; Alter, 1999; Rosário, Marques e Maluf, 2004).

Já o balístico é caracterizado por usar o momento do balanço de um segmento corporal de maneira rítmica para alongar o tecido. Neste tipo de alongamento utiliza-se a produção de tensão rápida e intensa num curto período de tempo. Alguns autores acreditam ser necessário ter precaução com o uso do alongamento balístico uma vez que o mesmo não permite adaptação muscular e neurológica adequada, estimula o reflexo de estiramento e promove maior

número de lesões nas fibras musculares (Alter, 1996; Rosário, Marques e Maluf, 2004).

A contração muscular excêntrica, caracterizada pelo afastamento da origem e inserção muscular aliado a contração do mesmo músculo, também pode ser considerada um tipo de alongamento (Rosário, Marques e Maluf, 2004). Segundo Lieber (2002), as contrações excêntricas são capazes de levar a aumento do número de sarcômeros em série e em paralelo, o que resulta em aumento da extensibilidade muscular, da amplitude de movimento articular e hipertrofia.

A facilitação neuromuscular proprioceptiva envolve técnicas que usam contrações isométricas breves do músculo a ser alongado antes do alongamento estático. Trata-se de uma técnica muito utilizada na reabilitação e esporte e que gera resultados satisfatórios (Alter, 1999; Rosário, Marques e Maluf, 2004).

Embora as diferentes técnicas sejam capazes de promover aumento na flexibilidade, alguns autores acreditam ser o alongamento estático o método mais utilizado por ser de fácil aplicação (Beaulieu, 1981; Bandy e Irion, 1994; Bandy, Irion e Briggler, 1997).

Diversos trabalhos suportam a utilização do alongamento com o intuito de prevenir ou reverter os efeitos deletérios da imobilização em posição encurtada.

Sendo assim, o alongamento é um recurso freqüentemente utilizado com o intuito de aumentar a amplitude de movimento, prevenir a proliferação de tecido conjuntivo e atrofia muscular, além de se tratar de um estímulo eficiente para o crescimento longitudinal do músculo e síntese de proteínas (Williams, 1988; Williams, 1990; Coutinho et al., 2004).

Williams (1990) ao avaliar os efeitos do alongamento estático com duração de 15, 30, 60 e 120 minutos, durante duas semanas no músculo sóleo encurtado, concluiu que o alongamento com duração de pelo menos 30 minutos é suficiente para prevenir a perda de sarcômeros, além de manter a amplitude de movimento normal de dorsiflexão. Observou ainda que períodos de 120 minutos de alongamento promovem aumento de 10% do número de sarcômeros em série.

Em estudo realizado com o intuito de avaliar os efeitos da aplicação do alongamento estático por dez dias, com duração de 15 minutos no músculo sóleo, observou-se que o protocolo utilizado não foi eficaz para prevenir a perda do número de sarcômeros em série, porém foi eficaz para impedir a proliferação do tecido conjuntivo, além de aumentar a amplitude de movimento, quando comparado ao grupo apenas imobilizado (Williams, 1988).

O fato de curtos períodos de alongamento não promoverem alteração muscular indica que existe um mínimo período de tempo necessário para que a tensão mantida inicie o processo adaptativo de regulação do número de sarcômeros (Williams, 1990).

Coutinho et al. (2004) ao analisarem os efeitos de sessões de alongamento passivo de 40 minutos, aplicado a cada três dias, durante três semanas, observaram que este procedimento empregado em músculos encurtados não foi capaz de prevenir a perda do número de sarcômeros em série, porém foi efetivo para proteger a atrofia. Já em músculos não encurtados, o protocolo utilizado resultou no aumento do número de sarcômeros em série e área de secção transversa da fibra, o que comprova a efetividade do protocolo de alongamento utilizado para induzir a sarcomerogênese.

Gomes et al. (2004) ao analisarem o efeito do alongamento passivo no sóleo encurtado aplicado uma vez por semana, por 40 minutos, por um período de três semanas, mostraram que o protocolo utilizado não foi eficaz para prevenir a perda do número de sarcômeros em série, mas sim atrofia muscular.

Os resultados encontrados nos estudos de Gomes et al. (2004) e Coutinho et al. (2004) sugerem que a regulação do número de sarcômeros e da área de secção transversa é realizada por diferentes mecanismos, podendo, dessa forma, ser observada diferenças em apenas uma das adaptações musculares após a realização de uma intervenção.

Apesar de existir diversos relatos mostrando os efeitos benéficos do alongamento estático para o músculo esquelético, muitos aspectos ainda não foram estabelecidos tais como a melhor duração, frequência e número de repetições.

Além disso, não está estabelecido se o alongamento contínuo promove o mesmo resultado que o alongamento intermitente. Apesar da comprovada eficácia do alongamento para o crescimento longitudinal do músculo, o efeito dos intervalos entre as séries de alongamento ainda não é conhecido. Diversos trabalhos realizados em humanos mostram resultados positivos tanto quando aplicado o alongamento estático contínuo como quando o alongamento é aplicado de forma intermitente (Bandy, Irion e Briggler, 1998; Roberts e Wilson, 1999). Porém, acredita-se que breves períodos de intervalo possam gerar diferentes respostas adaptativas (Antonio e Gonyea, 1993).

Além disso, deve ser ressaltado que todos os estudos realizados até o momento, comparando-se esses dois tipos de alongamento, contínuo e



intermitente, avaliaram a condição muscular de forma subjetiva, ou seja, somente por meio da amplitude de movimento articular, mensurada pela goniometria.

Em 1997, Webright, Randolph e Perrin compararam, por meio da goniometria, o efeito do alongamento estático mantido por 30 segundos com movimentos repetidos de 30 repetições de extensão de joelho. O tratamento foi realizado duas vezes ao dia, durante seis semanas, em indivíduos com encurtamento muscular de isquiotibiais. Os resultados obtidos permitiram concluir que as duas técnicas foram capazes de aumentar a amplitude de movimento, sem que houvesse diferenças significativas entre elas.

Bandy, Irion e Briggler (1998) em estudo realizado em indivíduos com encurtamento muscular de isquiotibiais, compararam o efeito de duas técnicas de alongamento aplicadas cinco vezes por semana, durante seis semanas. A primeira técnica consistia no alongamento estático mantido por 30 segundos, já a segunda era caracterizada por cinco segundos de movimento de extensão de joelho, cinco segundos de manutenção do joelho em extensão e cinco segundos de movimento de flexão para retornar a posição de início, sendo esse procedimento repetido durante 30 segundos. Após o período de intervenção pôde-se observar que as duas técnicas foram eficazes para aumentar a amplitude de movimento, porém o alongamento mantido mostrou ser mais efetivo, uma vez que promoveu um ganho de flexibilidade duas vezes maior que o cíclico.

Roberts e Wilson (1999) compararam o efeito de duas técnicas de alongamento passivo intermitente, aplicados três vezes por semana, por um período de cinco semanas, na amplitude de movimento articular passiva e ativa. O primeiro protocolo consistia em nove séries de alongamento de cinco segundos, totalizando 45 segundos de intervenção. O segundo protocolo consistia

em três repetições de 15 segundos, totalizando também 45 segundos de intervenção. Após as cinco semanas observou-se que os dois protocolos promoveram aumento da ADM quando comparado ao grupo controle, porém o grupo 15 segundos obteve maior ganho de amplitude ativa. Esses resultados sugerem que a duração da tensão imposta ao músculo é importante para as possíveis adaptações provocadas pelo alongamento.

A partir dos trabalhos citados pode-se observar a necessidade de estudos que avaliem a influência de sessões de alongamento contínuo e intermitente nas adaptações musculares de maneira objetiva, ou seja, avaliando variáveis como número de sarcômeros em série, área de secção transversa e densidade de área de tecido conjuntivo.

## **2.4 Viscoelasticidade**

Quando um tecido é exposto a força passiva de alongamento, ele se deforma de acordo com as propriedades do material. Dessa forma, se uma força constante for aplicada ao tecido, este tem seu comprimento aumentado de maneira tempo dependente, o que é conhecido como comportamento viscoelástico (Woo e Young, 1991).

Sendo assim, o músculo esquelético é considerado um tecido viscoelástico, uma vez que a sua quantidade de deformação depende do tempo. Se uma força constante for aplicada ao músculo, este tem seu comprimento aumentado ao longo do tempo, ou se um músculo for alongado em comprimento mantido constante, a força necessária diminui ao longo do tempo. Quando a força é removida, o músculo retorna vagarosamente a seu comprimento original, agindo

não simplesmente como um tecido elástico, uma vez que sua deformação é tempo dependente, nem como um tecido plástico, uma vez que não permanece alterado após a remoção da carga, mas sim como um tecido viscoelástico (Woo e Young, 1991; Mchugh et al., 1992; Lieber, 2002).

Deve-se ressaltar que o tecido muscular diferencia-se de outros tecidos como osso, cartilagem e ligamentos, por ser capaz de gerar tensão pela interação da actina e miosina, fator que influencia a extensibilidade muscular (Griffiths et al., 1993; Ettema e Huijing, 1994).

Devido ao seu comportamento viscoelástico, o músculo, ao ser mantido em posição alongada estaticamente, tem sua tensão passiva diminuída com o tempo e isso pode ser referido como o relaxamento do estresse viscoelástico (Mchugh et al., 1992).

Em estudo realizado por Magnusson, Aagaard e Nielson (2000) observou-se que o alongamento estático de 45 segundos resultou em relaxamento do estresse viscoelástico instantâneo de 18 a 20%. Porém, o comprimento prévio retornou em menos de uma hora.

Sabe-se que o alongamento passivo tem como efeito imediato o aumento da amplitude de movimento por meio de um decréscimo na viscoelasticidade, alterações na extensibilidade e aumento na tolerância ao alongamento (Best et al., 1994; Best, Hasselman e Garret, 1997; Shrier e Gossal, 2000; Rosário, Marques e Maluf, 2004). Já a longo prazo, o efeito do alongamento é traduzido na adição de sarcômeros em série com conseqüente aumento na excursão muscular (Deyne, 2001).

Entretanto, Magnusson (1998) afirma que o ganho de amplitude de movimento provocado por algumas semanas de alongamento não se explica nem

pela viscoelasticidade, nem pelo ganho de sarcômeros, mas sim por um aumento na tolerância ao alongamento. Esse ganho não é necessariamente acompanhado de aumento no comprimento muscular e isso tem sido erroneamente atribuído a mudanças histológicas do músculo.

Magnusson et al. (2000), ao avaliarem o efeito imediato do alongamento estático de 45 segundos em isquiotibiais, repetidos por três vezes, observaram que o alongamento não facilitou em nada o aumento da amplitude do alongamento seguinte, realizado após 30 segundos de descanso.

Quando forças de tração são continuamente aplicadas, o tempo requerido para alongar o tecido, a uma quantidade específica, varia inversamente com as forças usadas. Sendo assim, uma força muito grande pode provocar danos aos tecidos musculares, sendo difícil de ser mantida por um longo período, enquanto que um alongamento mais leve mantido por um tempo longo é mais seguro e eficaz (Warren, Lehmann e Koblanski, 1971).

Para que o alongamento aplicado no tecido muscular não provoque danos à unidade músculo tendínea, a tensão gerada é transmitida gradualmente aos diversos componentes musculares. Sendo assim, o estímulo mecânico gerado pelo alongamento é transmitido para a fibra muscular por meio da matriz extracelular, passando pelo sarcolema, atingindo moléculas intracelulares e o sistema contrátil (Deyne, 2001; Shah et al., 2004).

A força do alongamento passivo é transmitida para a fibra muscular a partir da matriz extracelular, principalmente perimísio e endomísio, por meio de seus componentes como colágeno e glicoproteínas. Em seguida, esta força é transmitida a proteínas integrais da membrana, como integrinas e distroglicanas. Posteriormente, o estímulo é recebido por proteínas do citoesqueleto conhecidas

como costâmeros, tais como: talina, vinculina, desmina, distrofina e outras, e em seguida a outros elementos do citoesqueleto não contrátil como alfa-actinina e filamentos intermediários, até enfim atingir o sistema contrátil (Deyne, 2001).

Esse estímulo mecânico imposto ao músculo durante o alongamento irá se distribuir tanto no sentido longitudinal como radial. Em estudo realizado por Street (1983) observou-se que a maior parte da transmissão de forças é realizada no sentido lateral, por meio de estruturas conhecidas como costâmeros. Os costâmeros consistem em proteínas que estão associadas à linha Z e que exercem importante papel na dissipação de forças.

Considerando a dissipação longitudinal do estresse, observa-se que a última região a receber o estímulo consiste na junção miotendínea, local de grande quantidade de proteínas costaméricas, como desmina (Tidball, 1992), distrofina (Law e Tidball, 1993), vinculina (Shear e Bloch, 1985) e integrina (Bao et al., 1993).

Diante dessas informações é de extrema importância o conhecimento dos efeitos de protocolos de alongamento contínuo e intermitente nas adaptações musculares.

### **3 OBJETIVO**

Avaliar e comparar os efeitos do alongamento estático contínuo e intermitente sobre as adaptações do músculo sóleo, normal e encurtado, de rato.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostra

Foram utilizados 45 ratos machos albinos, da linhagem *Wistar* ( $240\pm 50$ g). Os animais permaneceram em gaiolas de polietileno, em grupos de no máximo três ratos por gaiola e foram mantidos sob condições controladas de biotério (12h claro/escuro,  $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). Tiveram ainda, livre acesso à água e ração peletizada. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos (029/2006).

Para os procedimentos de imobilização, alongamento e coleta do músculo sóleo, os animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de Ketalar<sup>®</sup> (50mg/mL) e Rompun<sup>®</sup> (2g/100mL), na dose de 0.1mL/100g, na proporção 1:1. Após 22 dias do início do experimento os animais foram sacrificados por meio de deslocamento cervical.

### 4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais, sendo:

- a) Controle (C; n=7): animais livres na gaiola
- b) Imobilizado (I; n=9): animais imobilizados
- c) Imobilizado + alongamento estático contínuo (IAC; n=8): animais imobilizados e submetidos a sessões de alongamento estático contínuo

- d) Imobilizado + alongamento estático intermitente (IAI; n= 7): animais imobilizados e submetidos a sessões de alongamento estático intermitente
- e) Alongamento estático contínuo (AC; n= 7): animais submetidos a sessões de alongamento estático contínuo
- f) Alongamento estático intermitente (AI; n= 7): animais submetidos a sessões de alongamento estático intermitente

Para todos os grupos experimentais o número da amostra foi inicialmente de, no mínimo, sete animais. No entanto, alguns animais morreram durante o experimento, principalmente devido à anestesia, e algumas amostras musculares foram desprezadas.



### 4.3 Procedimentos para a imobilização

A imobilização foi realizada utilizando-se modelo descrito por Coutinho et al. (2002), por se tratar de uma órtese de baixo custo e fácil confecção. Além disso, o modelo utilizado permitia o ajuste ao animal sempre que necessário.

Para o procedimento da mesma, o tornozelo esquerdo dos animais foi posicionado em máxima flexão plantar (em torno de  $176^\circ$ ), garantindo assim a manutenção do músculo sóleo em posição de encurtamento (Figura 1) e mantido nessa posição por 21 dias.

Após a colocação das órteses, os ratos eram inspecionados duas vezes ao dia para garantir que as mesmas estavam posicionadas de maneira adequada, sendo as órteses recolocadas ou trocadas sempre que necessário.



**Figura 1.** Procedimento de imobilização

### 4.4 Alongamento

As sessões de alongamento tiveram início no 15º dia do experimento e foram realizadas uma vez ao dia, durante 40 minutos, por sete dias consecutivos, estando os animais previamente anestesiados. Para o alongamento estático

contínuo o tornozelo esquerdo era mantido manualmente em máxima dorsiflexão por 40 minutos, como mostra a figura 2. Já no alongamento estático intermitente, os animais tiveram a articulação do tornozelo mantida manualmente em máxima dorsiflexão, durante 60 segundos, com intervalo de 30 segundos entre as repetições totalizando, ao longo dos 40 minutos, 27 repetições. Durante os 30 segundos de repouso entre as séries, a resistência manual era retirada, sem que se retornasse a articulação à posição de flexão plantar.



**Figura 2.** Alongamento passivo do músculo sóleo realizado manualmente

Para minimizar o efeito da velocidade de alongamento aplicada, padronizou-se o tempo de cinco segundos para que se atingisse a máxima amplitude de dorsiflexão. Em todos os animais, a máxima dorsiflexão foi caracterizada como a máxima amplitude da articulação nesta posição, respeitando-se a resistência do tecido. Nos grupos imobilizados e posteriormente alongados, a órtese era removida para a aplicação do alongamento, sendo posteriormente recolocada. Nos animais submetidos somente ao alongamento, os

mesmos permaneceram livres na gaiola durante as duas primeiras semanas, sendo o alongamento iniciado no 15º dia.

#### **4.5 Análise da massa corporal**

Para analisar os efeitos do procedimento de imobilização e alongamento alteração de massa corporal dos animais, os mesmos foram pesados em balança digital no 1º e 22º dia do experimento. A análise da massa corporal foi realizada calculando-se a diferença de massa obtida do valor final e inicial, sendo o valor obtido definido como variação de massa corporal.

#### **4.6 Análise da massa muscular absoluta e relativa**

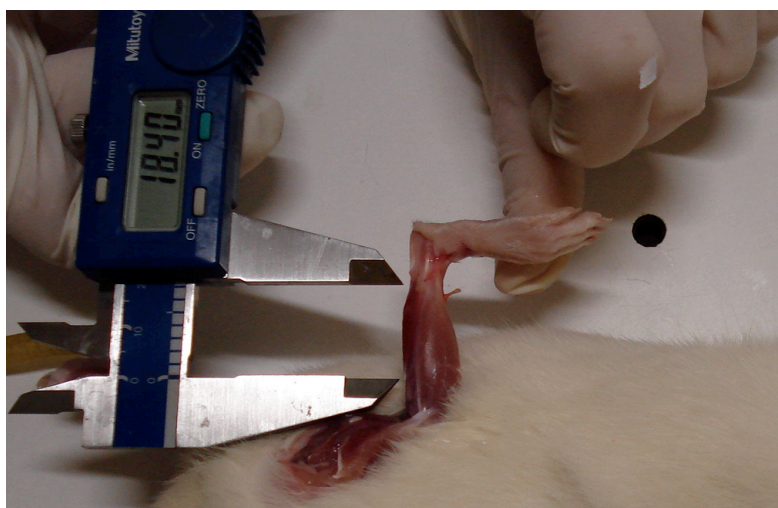
A massa muscular absoluta foi obtida por meio de balança digital, sendo apresentada em gramas. Já a massa muscular relativa foi obtida pela relação da massa muscular com a massa corporal, sendo caracterizada como porcentagem da massa corporal.

#### **4.7 Amplitude de movimento (ADM)**

A mensuração da ADM de dorsiflexão foi realizada no 1º e último dia do experimento e em todos os dias que houve aplicação do alongamento, previamente a este. Para tal, os animais foram anestesiados e a ADM mensurada por meio de goniômetro manual (CARCI®), tendo como referência o quinto metatarso, o maléolo lateral e o centro do joelho, como descrito por Okita et al. (2004). A mensuração foi realizada sempre pelo mesmo examinador e repetida três vezes, sendo utilizada para a análise dos dados a média entre as três medidas.

#### 4.8 Processamento dos músculos

Com o tornozelo mantido a 90° o músculo sóleo, ainda fixado ao osso, teve seu comprimento obtido por meio de paquímetro digital (MITUTOYO®), tendo como referência à distância entre as junções miotendíneas, como mostra a figura 3.

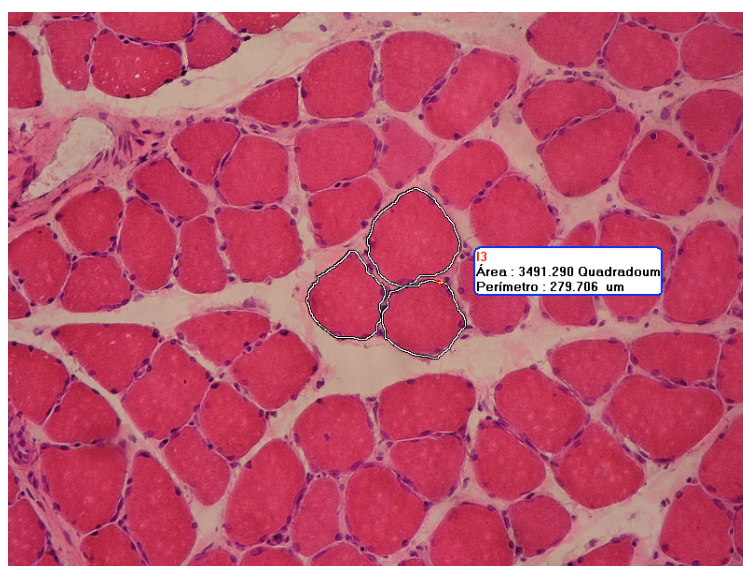


**Figura 3.** Mensuração do comprimento do sóleo

Em seguida, os animais tiveram o músculo sóleo retirado, pesado e dividido longitudinalmente em duas partes similares. A porção lateral, utilizada para a análise morfológica e morfométrica, foi presa em cortiça por meio de alfinetes e congelada em iso-pentano, pré-congelado em nitrogênio líquido, e mantida em nitrogênio líquido até o momento da obtenção dos cortes histológicos. A porção medial, utilizada para a análise das adaptações de sarcômero, também foi presa em cortiça, sendo o comprimento muscular no qual a amostra foi fixada, estipulado a partir do valor obtido da mensuração do músculo quando ainda fixado no osso. Posteriormente, a amostra foi fixada em 2.5% de glutaraldeído por três horas, colocada em solução de 30% de ácido nítrico por dois dias e mantida em 50% de glicerol até o momento da análise (Williams, 1988).

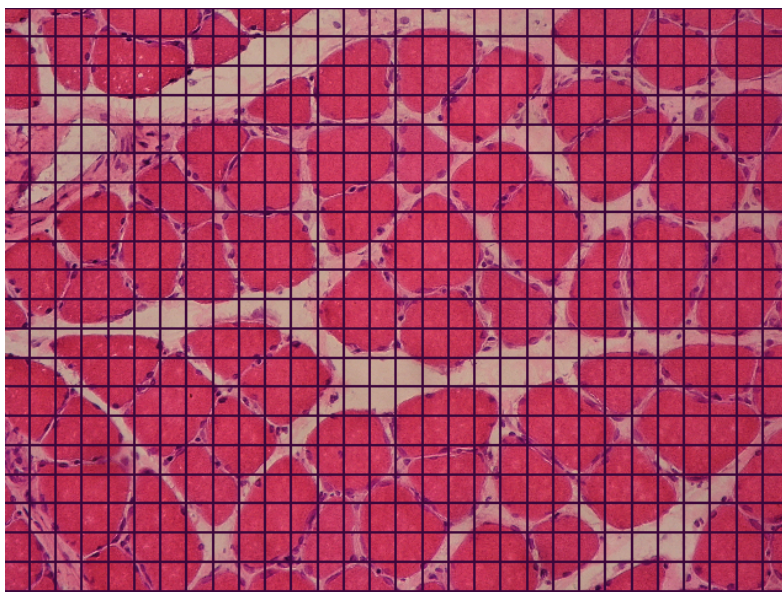
#### 4.9 Análise morfométrica

A porção lateral do sóleo foi seccionada na sua região ventral, no sentido proximal-distal, em cortes transversais de 10 $\mu$ m por meio de micrótomo criostato (Microm HM 505E, Zeiss, Alemanha) mantido à temperatura de -20°C. Os cortes foram corados com Hematoxilina Eosina (HE) e posteriormente foi realizada a captação das imagens (aumento de 20x) do melhor corte histológico, livre de artefatos, por meio de microscópio óptico (BX-41, Olympus®, Japão) e câmera (C5050, Olympus, Japão) acoplada em monitor Samsung®. Desse corte, foram selecionados aleatoriamente cinco campos e desses foi realizada a mensuração da área de secção transversa (AST) das fibras musculares e quantificação da densidade de área de tecido conjuntivo intramuscular (TC). A mensuração da AST foi realizada em aproximadamente 300-350 fibras musculares por meio do *Software Motic Images Advanced 3.2®* (Motic Instruments Canadá), circulando-se o contorno de cada fibra, como mostra a figura 4.



**Figura 4.** Mensuração da área de secção transversa das fibras

Para a mensuração do TC intramuscular foi utilizado o sistema de planimetria para a contagem dos pontos (Mathieu, 1981), o qual constava de 551 intersecções, sendo possível a quantificação do perimísio e endomísio, como mostra a figura 5.

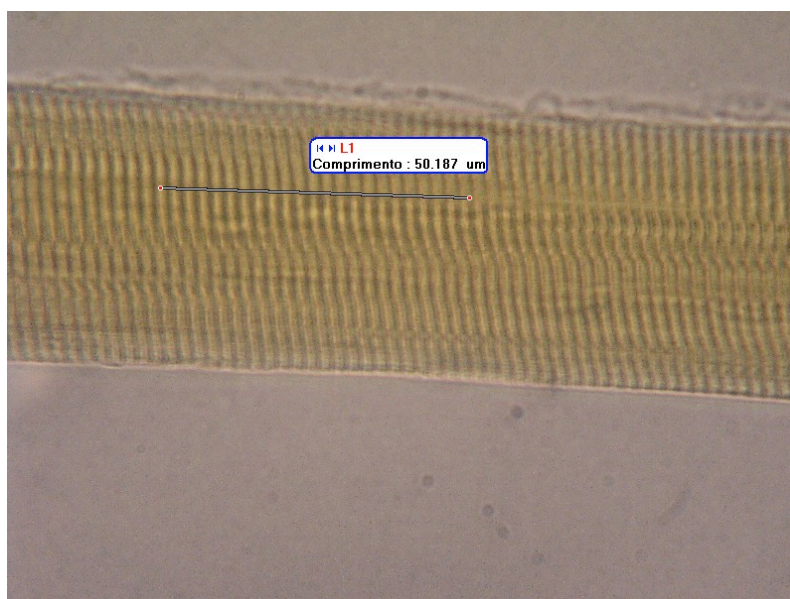


**Figura 5.** Planimetria para a contagem dos pontos

Todos os grupos experimentais tiveram um mínimo de seis músculos analisados para análise da AST e TC, com exceção do grupo IAI que, por problemas de artefato muscular, teve somente quatro músculos analisados para essas variáveis.

#### 4.10 Análise da adaptação de sarcômeros

Para esta análise, foram retiradas cinco fibras de cada músculo, tanto da região superficial como profunda do músculo, as quais foram colocadas em lâminas montadas com gelatina. Posteriormente, foram fotografados seis campos por fibra e de cada campo foi contado o número de sarcômeros ao longo de 50 $\mu$ m, somando 300 $\mu$ m/fibra, figura 6.



**Figura 6.** Procedimento para a contagem do número de sarcômeros em série

O número total de sarcômeros em cada fibra muscular foi determinado por correlação entre o número de sarcômeros identificados em uma distância de 300 $\mu$ m e o comprimento total do músculo, e a extensão média de cada sarcômero foi obtida pela divisão do comprimento muscular pelo número de sarcômeros. Para esta análise foi utilizado o *software Motic Image Advanced 3.2<sup>®</sup>* (Motic Instruments Canadá), câmera (C5050, Olympus<sup>®</sup>, Japão) acoplada a microscópio óptico (BX-41, Olympus<sup>®</sup>, Japão) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com objetiva de 100x.

Todos os grupos experimentais tiveram um mínimo de seis músculos analisados para análise das adaptações de sarcômeros, com exceção do grupo IAI que teve somente cinco músculos analisados para as variáveis comprimento muscular, número e extensão de sarcômeros.

#### **4.11 Análise estatística**

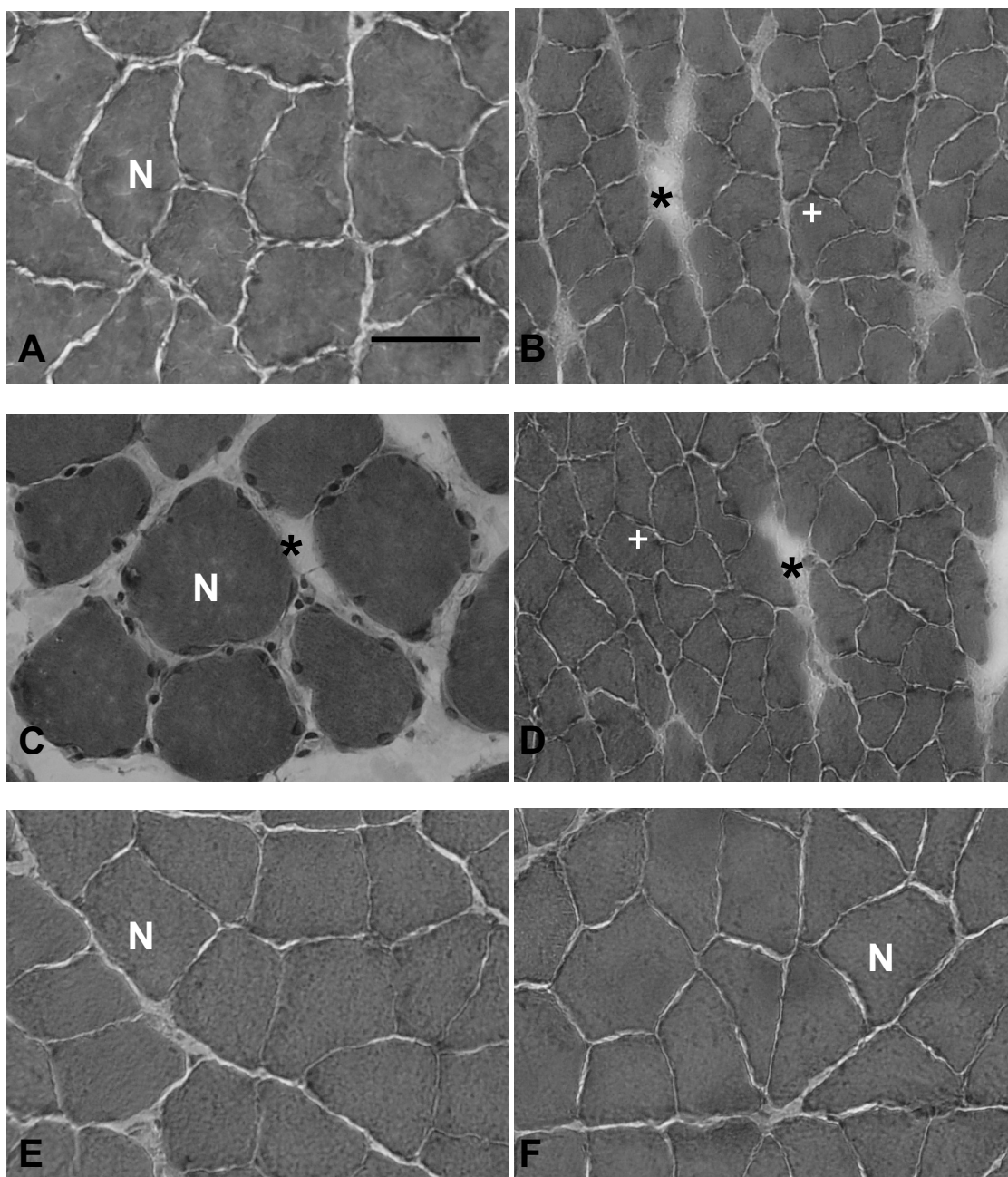
Para análise dos dados foram utilizados recursos dos *softwares* SPSS 11.0<sup>®</sup> e Bioestat 4.0<sup>®</sup>. Inicialmente foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para testar a normalidade da amostra e o teste de Levene para avaliar a homocedasticidade entre os grupos. Posteriormente, para os dados paramétricos aplicou-se o teste ANOVA F seguido de Pos hoc Tukey, e para os dados não paramétricos aplicou-se o Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Em todos os cálculos foi estabelecido um nível de significância de 5% e os valores foram expressos em média e desvio padrão.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise morfológica

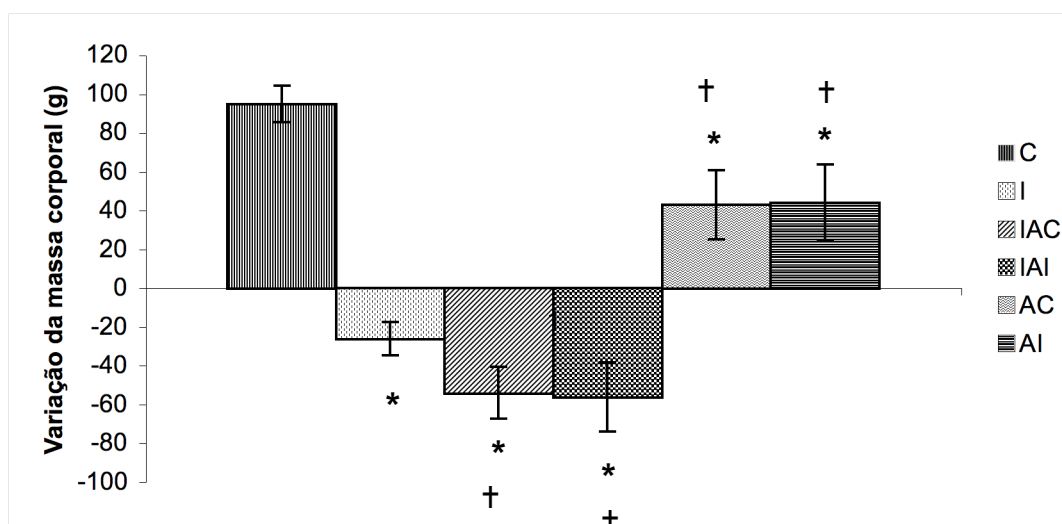
A análise morfológica do sóleo controle mostrou aspecto de fibras normais, com as mesmas apresentando formato hexagonal e núcleos periféricos (Figura 7A). Em contrapartida, o sóleo imobilizado (Figura 7B) mostra redução da área de secção transversa e aumento da densidade de tecido conjuntivo, quando comparado ao controle. O sóleo submetido à imobilização e posteriormente a sessões de alongamento contínuo (Figura 7C) apresenta fibras com aspecto morfológico similar ao controle, no entanto, é possível observar aumento na densidade de tecido conjuntivo. A análise do sóleo imobilizado e submetido a sessões de alongamento intermitente (Figura 7D) mostra diminuição da área de secção transversa e aumento da densidade de tecido conjuntivo, quando comparado ao animal controle, o que foi confirmado pela análise morfométrica. A avaliação do sóleo dos animais submetidos apenas a protocolos de alongamento contínuo (Figura 7E) e intermitente (Figura 7F) revela fibras de aspecto normal, com formato hexagonal e núcleos periféricos.



**Figura 7.** Cortes histológicos transversais do músculo sóleo controle (A), imobilizado (B), imobilizado e submetido a sessões de alongamento contínuo (C), imobilizado e submetido a sessões de alongamento intermitente (D), submetido a sessões de alongamento contínuo (E) e submetido a sessões de alongamento intermitente (F). Observa-se fibras com aspecto normal, evidenciada por presença de núcleos periféricos e formato hexagonal (N), aumento na densidade de tecido conjuntivo (asterisco) e diminuição na área de secção transversa das fibras (cruz). Coloração Hematoxilina Eosina. (Barra: 50µm).

## 5.2 Variação da massa corporal

Após o período experimental observou-se que os animais dos grupos AC e AI apresentaram aumento da massa corporal, enquanto os grupos I, IAC e IAI apresentaram redução da mesma, sendo todos os grupos diferentes do grupo C (AC=  $43 \pm 17$ g; AI=  $44 \pm 19$ g; I=  $-26 \pm 8$ g; IAC=  $-54 \pm 13$ g; IAI=  $-56 \pm 17$ g; C=  $95 \pm 9$ g;  $p \leq 0.000009$ ). Além disso, os grupos IAC e IAI apresentaram diminuição significativamente maior do que os animais apenas imobilizados ( $p \leq 0.007$ ; Figura 8).



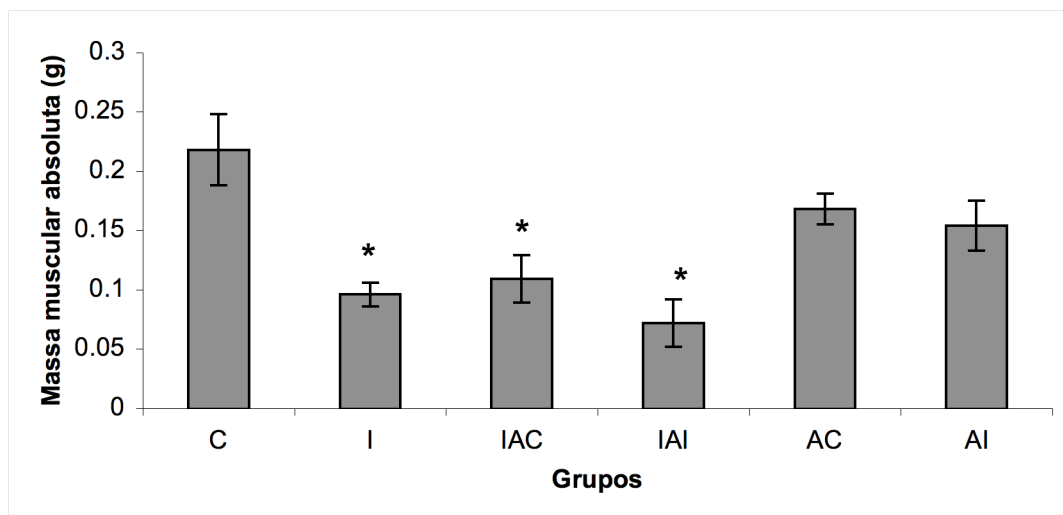
**Figura 8.** Variação da massa corporal nos diferentes grupos experimentais

\* Diferença significativa quando comparado ao grupo C;  $p \leq 0.000009$

† Diferença significativa quando comparado ao grupo I;  $p \leq 0.007$

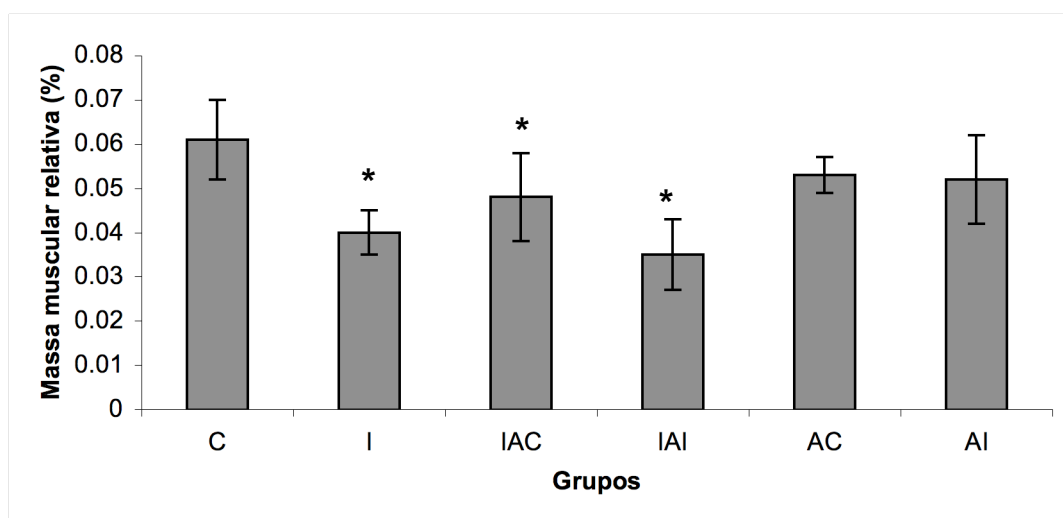
### 5.3 Massa muscular absoluta e relativa

Somente os animais submetidos à imobilização apresentaram redução da massa muscular quando comparado ao grupo C. Esta redução foi observada tanto para a massa absoluta (I=  $0.096 \pm 0.011\text{g}$ ; IAC=  $0.109 \pm 0.023\text{g}$ ; IAI=  $0.072 \pm 0.023\text{g}$ ; C=  $0.218 \pm 0.037\text{g}$ ;  $p \leq 0.05$ ), como para a massa relativa (I=  $0.040 \pm 0.005\%$ ; IAC=  $0.048 \pm 0.010\%$ ; IAI=  $0.035 \pm 0.008\%$ ; C=  $0.061 \pm 0.009\%$ ;  $p \leq 0.03$ ; Figuras 9 e 10). Não foram observadas diferenças significativas entre os protocolos contínuo e intermitente, nem entre o grupo apenas imobilizado e os grupos imobilizado e alongados.



**Figura 9.** Massa muscular absoluta dos diferentes grupos experimentais

\* Diferença significativa quando comparado ao grupo C;  $p \leq 0.05$



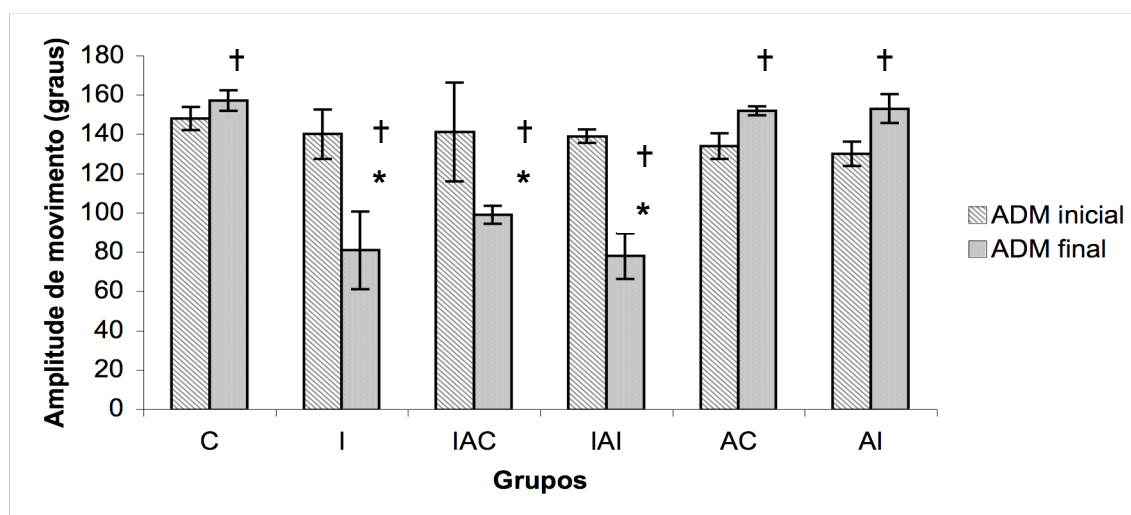
**Figura 10.** Massa muscular relativa dos diferentes grupos experimentais

\* Diferença significativa quando comparado ao grupo C;  $p \leq 0.03$

## 5.4 Amplitude de movimento

Todos os grupos apresentaram no primeiro dia do experimento ADM similar entre eles, não havendo diferença significativa entre os grupos. Porém, ao comparar-se a ADM final dos diferentes grupos experimentais observou-se redução significativa nos grupos I, IAC e IAI quando comparados ao grupo C ( $82 \pm 20^\circ$ ;  $99 \pm 5^\circ$ ;  $78 \pm 12^\circ$ ;  $157 \pm 2^\circ$ ; respectivamente;  $p \leq 0.05$ ; Figura 11), não havendo diferença entre eles.

Na avaliação intragrupo observou-se que todos os grupos experimentais apresentaram alteração significativa quando comparado seus valores iniciais e finais. Para os grupos C, AC e AI observou-se aumento significativo na ADM de  $6 \pm 5\%$ ,  $14 \pm 6\%$  e  $18 \pm 6\%$ , respectivamente. Já os grupos I, IAC e IAI mostraram redução da ADM de  $41 \pm 16\%$ ,  $28 \pm 17\%$  e  $44 \pm 9\%$ , respectivamente.

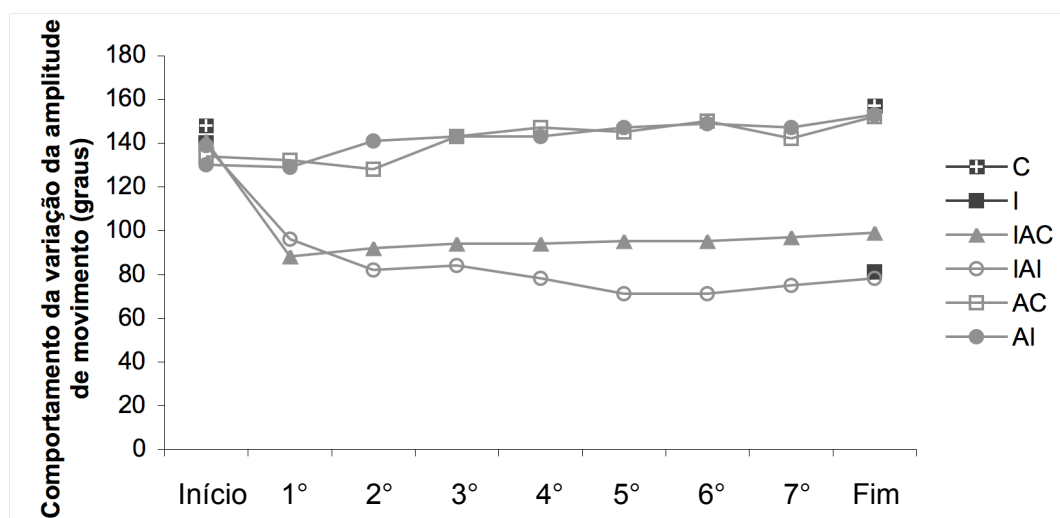


**Figura 11.** Amplitude de movimento inicial e final dos diferentes grupos experimentais

\* Diferença significativa quando comparado ao C;  $p \leq 0.05$

† Diferença significativa quando comparado a ADM inicial;  $p \leq 0.01$

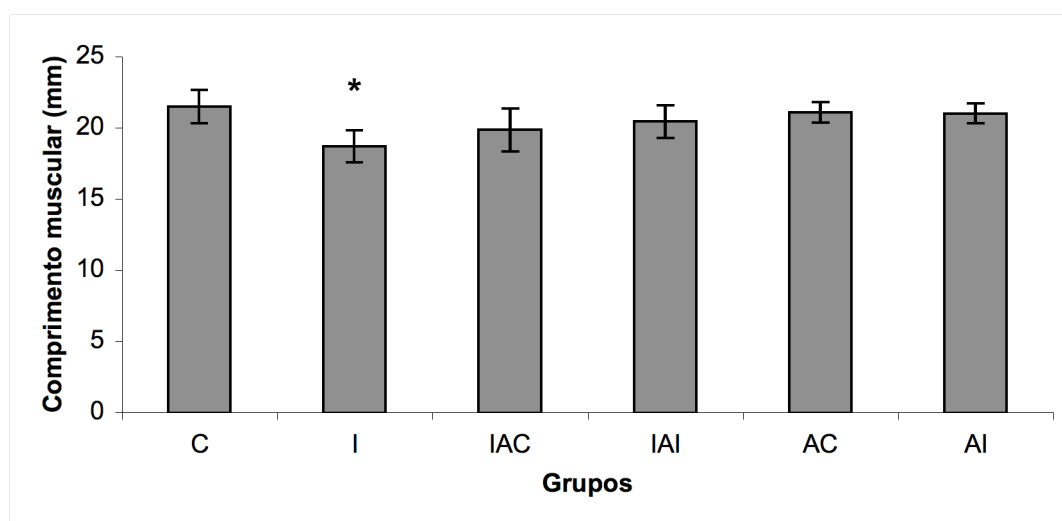
A figura 12 mostra o comportamento da variação da amplitude de movimento durante todo o período experimental: o início do experimento, os sete dias de aplicação do alongamento e o dia do sacrifício. Observa-se que todos os grupos experimentais apresentaram valor inicial de ADM similar. Durante a aplicação do alongamento os grupos AC e AI apresentaram comportamento semelhante, com valores de ADM próximos entre eles. Do mesmo modo, os grupos IAC e IAI também apresentaram comportamento semelhante, isto é, ambos mostraram redução da ADM após a imobilização, que se manteve diminuída durante todo o período de aplicação do alongamento. No entanto, o grupo IAI apresentou valores médios menores que o IAC. Interessante observar que no último dia do experimento os grupos C, AC e AI apresentaram valores médios similares, o mesmo ocorrendo entre os grupos I, IAC e IAI.



**Figura 12.** Comportamento da variação da amplitude de movimento nos diferentes grupos experimentais durante o período experimental

## 5.5 Comprimento muscular

Somente o grupo I apresentou redução no comprimento muscular quando comparado ao grupo C ( $18.69 \pm 1.14\text{mm}$ ;  $21.49 \pm 1.16\text{mm}$ ; respectivamente;  $p=0.0002$ ), sendo esta, em média, de 13%, como mostra a figura 13.



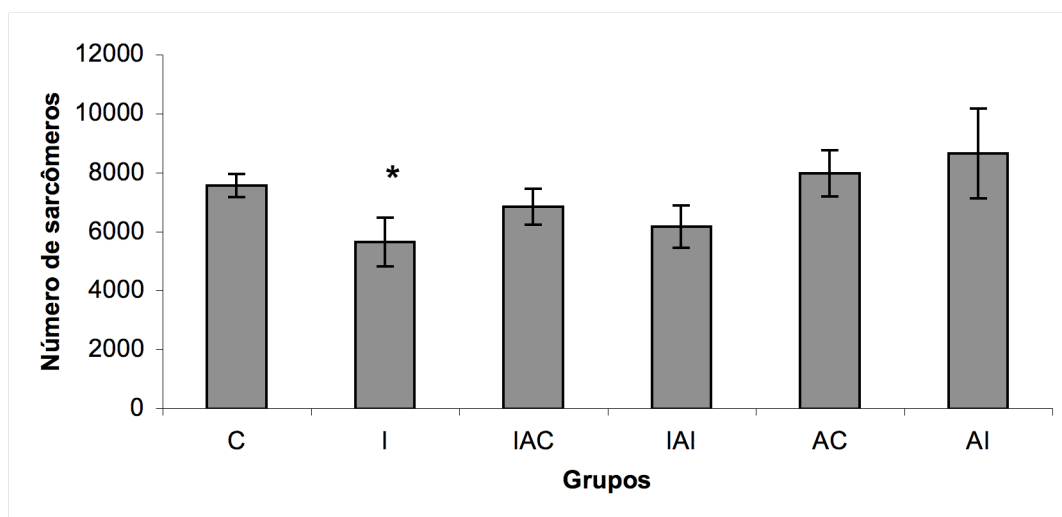
**Figura 13.** Comprimento muscular dos diferentes grupos experimentais

\* Diferença significativa quando comparado ao C;  $p=0.0002$



## 5.6 Número de sarcômeros em série

Somente o grupo I apresentou redução no número de sarcômeros em série quando comparado ao grupo C ( $5984 \pm 832$ ;  $7551 \pm 394$ ; respectivamente;  $p < 0.05$ ), sendo esta, em média, de 21%, como mostra a figura 14.

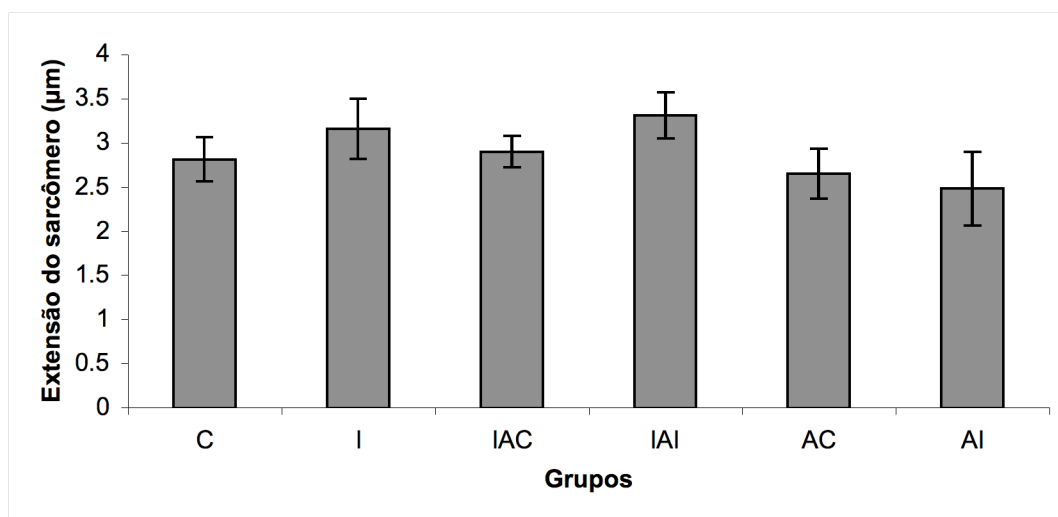


**Figura 14.** Número de sarcômeros dos diferentes grupos experimentais

\* Diferença significativa quando comparado ao grupo C;  $p < 0.05$

## 5.7 Extensão do sarcômero

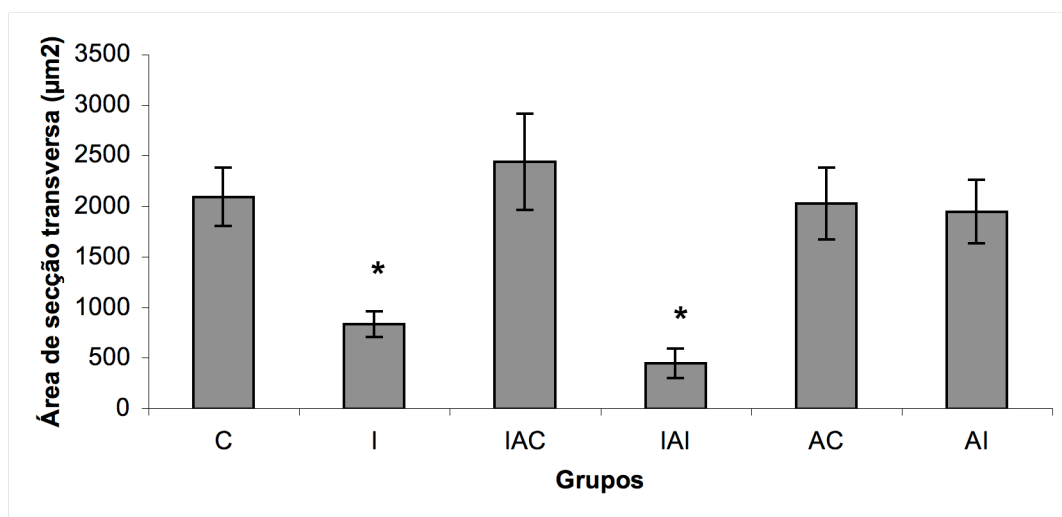
Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais com relação ao controle.



**Figura 15.** Extensão do sarcômero nos diferentes grupos experimentais

## 5.8 Área de secção transversa

Observou-se diminuição da área de secção transversa nos grupos I e IAI quando comparado ao C ( $831 \pm 129\mu\text{m}^2$ ;  $446 \pm 146\mu\text{m}^2$ ;  $2092 \pm 290\mu\text{m}^2$ ; respectivamente;  $p \leq 0.000007$ ), sendo esta, em média, de 60% e 79% respectivamente, como mostra a figura 16.

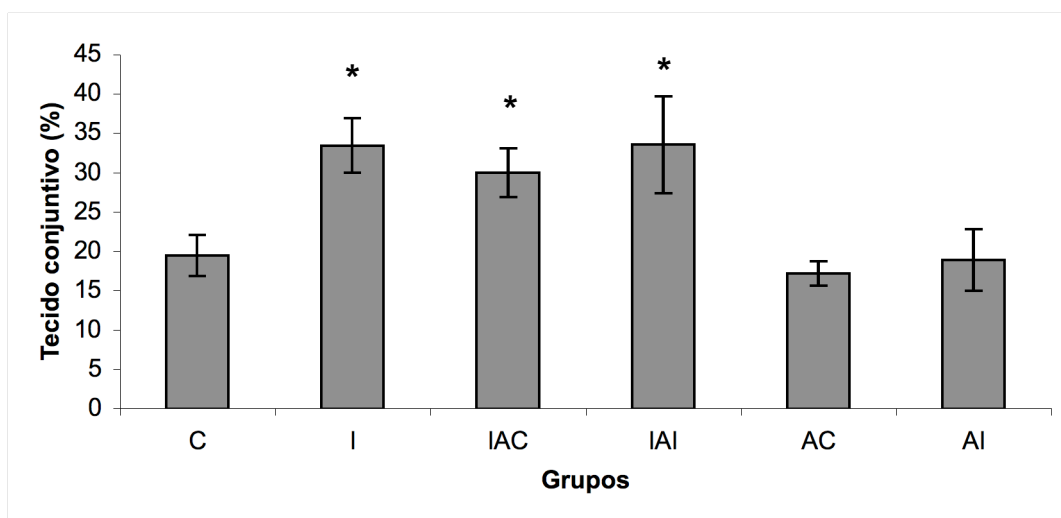


**Figura 16.** Área de secção transversa dos diferentes grupos experimentais

\* Diferença significativa quando comparado ao C;  $p \leq 0.000007$

### 5.9 Densidade de área de tecido conjuntivo intramuscular

Observou-se aumento significativo do tecido conjuntivo intramuscular nos grupos I, IAC e IAI quando comparado ao grupo C ( $33 \pm 3\%$ ;  $33 \pm 1\%$ ;  $34 \pm 3\%$ ;  $17 \pm 1$ ; respectivamente;  $p \leq 0.05$ ; Figura 17), sendo este aumento, em média, de 72%, 54% e 72%, respectivamente, não havendo diferença entre eles.



**Figura 17.** Porcentagem de tecido conjuntivo intramuscular nos diferentes grupos experimentais

\* Diferença significativa quando comparado ao grupo C;  $p \leq 0.05$

## **6 Discussão**

### **6.1 Massa corporal e muscular**

Após o período experimental observou-se aumento da massa corporal no grupo controle, o que é justificado pelo crescimento normal do animal, como era de se esperar. Já o grupo imobilizado apresentou diminuição da massa corporal de aproximadamente 10%, o que está de acordo com estudos prévios que utilizaram o mesmo tipo de órtese e o mesmo período de três semanas de imobilização (Coutinho et al., 2004; Gomes et al., 2004). Ainda sim, pôde-se observar que com o uso deste tipo de órtese a perda de massa corporal foi minimizada quando comparado com resultados da literatura, os quais relatam diminuição em torno de 20% na massa corporal de animais imobilizados com órtese de gesso (Ansved, 1995; Harjola et al., 2000).

Os animais imobilizados e posteriormente submetidos a sessões de alongamento também apresentaram diminuição da massa corporal. Esta redução em todos os grupos imobilizados pode ser atribuída a fatores como menor ingestão de alimentos devido à limitação de movimento e ao estresse provocado pela imobilização (Ansved, 1995).

Além disso, observou-se redução da massa corporal significativamente maior nos grupos imobilizados e submetidos a sessões de alongamento quando comparado aos animais somente imobilizados. Acredita-se que esta redução seja devido ao estresse sofrido pelo animal com a aplicação diária de anestesia para a realização das sessões de alongamento. Esta hipótese pode ser comprovada pelo fato dos animais dos grupos somente alongados, que não foram imobilizados,

mas foram anestesiados durante os sete dias de alongamento, terem apresentado ganho de massa corporal significativamente menor do que o grupo controle.

Em relação à massa muscular observou-se diminuição nos grupos submetidos à imobilização, sendo que não houve diferença entre o grupo somente imobilizado com os grupos imobilizados e alongados, mostrando que os procedimentos de alongamento não influenciaram a massa muscular. Esses resultados são condizentes com o estudo de Coutinho et al. (2004), que ao analisarem os efeitos do alongamento de 40 minutos, aplicado a cada três dias, durante três semanas, em músculo encurtado, observaram que o mesmo também não foi eficaz para prevenir a redução da massa muscular, sendo a mesma de 46%.

Essa diminuição de massa muscular ocorrida após o período de imobilização foi causada, provavelmente, pela hipocinesia, o que levou a uma diminuição da síntese protéica e maior degradação de proteínas, o que corrobora com achados da literatura (Zarzhevsky et al., 1999; Harjola et al., 2000).

Entretanto, existe relato da eficácia do alongamento em prevenir a perda da massa muscular em músculos imobilizados. Williams (1990) observou que a aplicação diária de alongamento durante 30 minutos, por duas semanas, em músculo encurtado, levou a redução de apenas 9% da massa muscular, enquanto que os animais apenas imobilizados apresentaram redução de 48%.

O presente estudo mostrou ainda que os mesmos procedimentos de alongamento, contínuo e intermitente, aplicados em músculos normais, não são estímulos eficazes para alterar a massa muscular.

## 6.2 Adaptação de sarcômeros

Sabe-se que a imobilização em posição de encurtamento induz a perda do número de sarcômeros em série, que pode ser acompanhada, conseqüentemente, de redução no comprimento muscular (Tabary et al., 1972; Williams e Goldspink, 1978; Williams, 1988; Williams, 1990; Coutinho et al., 2004). No presente estudo, após o período experimental, observou-se no grupo imobilizado redução de 13% no comprimento muscular e diminuição de 21% no número de sarcômeros em série.

Esses resultados são condizentes com relatos da literatura, os quais mostram redução média de 19% do número de sarcômeros após 14 dias de imobilização (Williams, 1990) e de  $23 \pm 15\%$  após imobilização por três semanas (Gomes et al., 2004). Além disso, Coutinho et al. (2004) observaram redução de  $19 \pm 7\%$  no comprimento muscular de animais submetidos a três semanas de imobilização.

No entanto, tem sido demonstrado que quando o músculo imobilizado em posição de encurtamento é submetido a alongamentos periódicos ocorre redução na perda do número de sarcômeros ou ainda incremento no número de sarcômeros em série (Williams, 1990).

No presente trabalho não foram observadas diferenças significativas para as variáveis comprimento muscular e número de sarcômeros em série, quando comparado os grupos IAC e IAI ao grupo controle. Estes resultados mostram que os protocolos utilizados, tanto contínuo como intermitente, quando aplicados em músculos encurtados, foram eficazes para retornar o número de sarcômeros em série e comprimento muscular aos valores prévios.

Além disso, deve-se ressaltar que os grupos IAC e IAI apresentaram respostas similares na adaptação de sarcômeros, não havendo diferenças significativas entre eles. Os resultados encontrados sugerem que a manutenção do estímulo de alongamento, ou seja, contínuo por um longo período ou com intervalos durante sua aplicação, não influencia nas adaptações de sarcômero.

Williams (1990) avaliou o efeito de sessões diárias de alongamento por 14 dias, em músculo encurtado e observou que períodos de 30 minutos de alongamento foram suficientes para prevenir a perda do número de sarcômeros, enquanto que duas horas de aplicação levaram a aumento de 10% no número de sarcômeros em série.

No entanto, em estudo realizado por Coutinho et al. (2004) observou-se que a aplicação de alongamento por 40 minutos, em músculo encurtado, por 21 dias, três vezes por semanas não foi capaz de prevenir a perda de sarcômeros em série. Diante desses estudos, acredita-se que a frequência e duração da aplicação do alongamento poderia influenciar a resposta muscular.

Com relação aos grupos apenas alongados não foram observadas alterações no número de sarcômeros em série, comprimento muscular e extensão do sarcômero, quando comparados ao grupo controle, mostrando que o mesmo procedimento de alongamento, quando aplicado em músculos normais, não é capaz de gerar adaptações musculares. Sendo assim, acredita-se que o estímulo necessário para gerar adaptações de sarcômero seja distinto em músculos encurtados e normais, não submetidos ao encurtamento.

Pouco sabe-se a respeito dos mecanismos que regulam o crescimento muscular longitudinal. Acredita-se que a adição de novos sarcômeros ocorra nas



extremidades da fibra muscular e que a junção miotendínea seja um local chave para a produção de novos sarcômeros (Dix e Eisenberg, 1990).

Segundo Caiozzo et al. (2002) o músculo esquelético apresenta um sistema de controle que regula o crescimento longitudinal. De acordo com essa teoria, para que ocorra adição de sarcômeros em série o estímulo de alongamento deve aumentar a extensão do sarcômero até um determinado comprimento, conhecido como “set point”. A partir do momento que o “set point” é atingido o músculo responde adicionando mais sarcômeros. Sugere-se que o músculo sóleo de ratos apresenta um “set point” de  $2,7\mu\text{m}$  e que só após atingido este comprimento de sarcômero o músculo responderia com a produção de novas unidades funcionais.

Apesar do conhecimento sobre os fatores que regulam o crescimento longitudinal ser limitado, estudo realizado com alongamento mostrou aumento na expressão de isoformas de miosina embrionárias e neonatais durante a sarcomerogênese. Acredita-se que a regulação do crescimento longitudinal também seja dependente da ativação de células satélites, mediada por aumento no IGF-1. Além disso, tem sido relatado aumento na expressão da ciclina D1, que consiste em fator chave da divisão celular (Caiozzo et al., 2002).

Estudos mostram que uma isoforma do óxido nítrico neuronal está envolvida na regulação do número de sarcômeros em série. A óxido nítrico sintase neuronal está concentrado na junção músculo-tendínea e é regulado positivamente por um estímulo mecânico, como o alongamento estático, e possivelmente age como um mecanotransdutor para a adição de sarcômeros em série (Chang et al., 1996). A óxido nítrico sintase neuronal parece influenciar a síntese de proteínas do citoesqueleto (Bishopric, Javaseka e Webster, 1992) e a

fusão de células satélites na extremidade da célula muscular, eventos estes que ocorrem durante a adição de sarcômeros (Williams e Goldspink, 1971).

Segundo Williams e Goldspink (1978) a diminuição do número de sarcômeros em série é acompanhada de um aumento na extensão dos sarcômeros restantes, enquanto que um aumento do número de sarcômeros em série é acompanhado da redução no comprimento dos sarcômeros. Estas alterações ocorrem com o intuito de ajustar a extensão dos sarcômeros para permitir que o músculo desenvolva máxima tensão no novo comprimento.

Apesar de ter sido observada redução do número de sarcômeros em série no grupo I, no presente estudo não foram observadas diferenças significativas na extensão do sarcômero de nenhum dos grupos experimentais com relação ao controle. Observou-se apenas um valor médio da extensão do sarcômero maior no grupo I quando comparado aos grupos apenas alongados, sendo, em média, de 3.1 para o grupo I, 2.6 para o GAC e 2.4 para o GAI. Este resultado pode sugerir que os grupos estejam passando por adaptações musculares.

### **6.3 Área de secção transversa**

Após o período de imobilização observou-se redução média de 60% da área de secção transversa das fibras musculares no grupo imobilizado quando comparado ao grupo controle. Este resultado está de acordo com os achados da literatura que relatam atrofia muscular após períodos de imobilização em posição encurtada (Coutinho et al., 2004; Gomes et al., 2004; Mattiello-Sverzut, 2006; Gomes et al., 2007). Sabe-se que o processo de atrofia constitui uma resposta do

tecido muscular em situações de tensão e/ou carga mecânica reduzida, na tentativa de manter um funcionamento eficiente e ajustado às novas exigências funcionais (Edgerton et al., 2002).

Trata-se de um processo altamente ordenado e regulado (Cros et al., 1999) com inúmeras alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que repercutem na funcionalidade dos músculos afetados (Appell, 1990). Dentre as mudanças que acompanham a atrofia têm-se modificações celulares, como degradação de endotélio (Oki et al., 1995), redução do número de mitocôndrias (Mujika e Padilla, 2001), acúmulo de tecido conjuntivo (Williams et al., 1988), diminuição na densidade capilar (Hudson e Franklin, 2003), redução de mionúcleos (Smith et al., 2000), alterações do tipo de fibra (Booth, 1982), redução de proteínas contráteis, aumento da fadiga (Edgerton et al., 2002) e diminuição da força muscular (Cohen et al., 1999).

Com relação aos grupos imobilizados e submetidos a sessões de alongamento, apenas o grupo intermitente apresentou redução da área de secção transversa, sendo a mesma de 79% em relação ao grupo controle. Sendo assim, observa-se que somente o protocolo de alongamento contínuo foi eficaz para reverter a atrofia muscular causada pelas duas semanas de imobilização, sugerindo que a duração da tensão muscular pode ser fator importante no mecanismo de hipertrofia muscular.

Coutinho et al. (2004), avaliaram o efeito de 40 minutos de alongamento contínuo, aplicado a cada três dias em músculo encurtado, por um período de três semanas e observaram que o grupo somente imobilizado apresentou redução de  $37 \pm 31\%$  na AST, enquanto que o grupo imobilizado e alongado apresentou redução de apenas  $22 \pm 40\%$ . Os resultados encontrados

mostraram que o procedimento aplicado não retornou a AST aos valores iniciais, porém, foi eficaz para reduzir a atrofia muscular.

Em estudo semelhante realizado por Gomes et al. (2004), os autores avaliaram a resposta muscular à protocolo de alongamento contínuo com duração de 40 minutos, por um período de três semanas, porém, com aplicação do alongamento apenas uma vez por semana. Os autores observaram que o protocolo utilizado também não foi eficaz para retornar a AST à seus valores iniciais, porém, reduziu a atrofia muscular.

Ao comparar os resultados encontrados no presente estudo com os resultados encontrados por Coutinho et al. (2004) e Gomes et al. (2004) pode-se dizer que o protocolo contínuo utilizado neste estudo mostrou-se melhor já que foi eficaz não somente para reduzir a atrofia muscular mas também retornar a AST à seus valores iniciais. No entanto, deve-se ressaltar que os trabalhos citados realizaram a aplicação do alongamento desde o primeiro dia de imobilização enquanto que o presente estudo só iniciou a aplicação do alongamento após duas semanas de imobilização, e como já citado, a condição prévia do músculo pode influenciar a resposta muscular.

A manutenção da capacidade funcional e da massa muscular é controlada por um balanço entre as vias de síntese e de degradação protéica (Bodine et al., 2001). Sabe-se que o crescimento muscular radial envolve aumento na síntese de proteínas e na transcrição de genes específicos, e está relacionado com a quantidade de tensão desenvolvida, a qual estimula a produção de MGF, Mechanical Growth Factor. (Lowe, Lund e Alway, 1998). Acredita-se que o protocolo de alongamento contínuo utilizado neste trabalho

tenha gerado níveis de tensão superiores ao intermitente e por este motivo tenha desencadeado uma resposta hipertrófica, enquanto que o intermitente não.

Yang et al (1997) mostraram que o alongamento por meio da imobilização em posição alongada induziu um aumento na expressão do IGF -1 RNAm em cada fibra muscular, além de um aumento na porcentagem de fibras expressando miosina neonatal. Os autores sugerem que a expressão de IGF-1 está relacionado com a hipertrofia e com uma adaptação do fenótipo muscular causada pelo alongamento e sobrecarga.

Estudos mostram que o alongamento é eficaz para aumentar a expressão gênica da myoD, fator regulatório miogênico, sugerindo que este estímulo esteja relacionado com a hipertrofia.

Com relação aos grupos apenas alongados não foram observadas alterações significativas na área de secção transversa quando comparado ao grupo controle mostrando que os protocolos aplicados, tanto contínuo como intermitente, não foram eficazes para gerar hipertrofia muscular.

Entretanto, em estudo realizado por Coutinho et al. (2004) com o intuito de analisar a resposta do músculo normal, não submetido a imobilização, a sessões de alongamento contínuo por 40 minutos, por um período de 21 dias, três vezes por semana, observou-se aumento significativo na área de secção transversa. O resultado encontrado pelos autores mostrou o efeito hipertrófico do alongamento mesmo em músculos normais.

No entanto, deve-se ressaltar que o estudo citado apresenta relevantes diferenças metodológicas quando comparado ao presente estudo, como número e frequência de aplicação de alongamento. Acredita-se que a tensão gerada pelos

protocolos aplicados neste estudo não foram estímulos eficazes para permitir adaptação em músculos normais.

Sabe-se que um mínimo período de tempo é necessário para que a tensão mantida inicie o processo adaptativo. Apesar do alongamento contínuo aplicado neste trabalho gerar aumento da área de secção transversa em músculo encurtado, não foram observadas alterações significativas nos músculos normais submetidos a mesmo protocolo, o que sugere também que a condição prévia do músculo influencia a resposta muscular.

#### **6.4 Densidade de área de tecido conjuntivo intramuscular**

Após o período experimental observou-se aumento médio da densidade de tecido conjuntivo intramuscular de 72% no grupo imobilizado, quando comparado ao grupo controle. Este resultado está de acordo com os achados da literatura que mostram aumentos significativos na densidade de tecido conjuntivo, principalmente perimísio e endomísio, logo nos estágios iniciais de imobilização (Williams e Goldspink, 1984; Williams, 1988).

No entanto, estudos mostram que a atividade contrátil e o alongamento passivo são estímulos capazes de prevenir o acúmulo de tecido conjuntivo após períodos de imobilização em posição de encurtamento. Williams e Goldspink (1988) avaliaram a densidade do tecido conjuntivo intramuscular após período de sete dias de imobilização e imobilização associada à eletroestimulação e observaram que a estimulação foi capaz de prevenir o aumento da densidade de tecido conjuntivo, mostrando a importância da atividade contrátil para manutenção desta variável.

Williams (1988) ao analisar o efeito das sessões de alongamento de 15 minutos, aplicados por um período de dez dias, a cada dois dias, em músculo imobilizado em posição de encurtamento, também observou que o mesmo foi capaz de prevenir o aumento da densidade de tecido conjuntivo.

Entretanto, no presente trabalho o tratamento por meio de alongamento, tanto contínuo como intermitente, não foi eficaz para impedir ou reverter o aumento da densidade de tecido conjuntivo provocado pela imobilização. No entanto, os estudos citados empregaram diferentes metodologias para quantificar a densidade de tecido conjuntivo, o que pode ter levado a resultados distintos entre os estudos.

Importante também considerar que a influência do alongamento para a extensibilidade muscular deve-se não apenas a quantidade de tecido conjuntivo, mas também a qualidade deste tecido, e o presente estudo não avaliou variáveis como arranjo, distribuição e tipo de colágeno.

O colágeno consiste em uma das principais proteínas do tecido conjuntivo intramuscular e sua elasticidade depende da quantidade, tipo, número de ligações cruzadas e arranjo de suas fibras (Borg e Caulfield, 1980; Rowe, 1981; Ahtikoski et al., 2003). Sua função no músculo consiste no suporte do tecido, além de receber forças mecânicas e as distribuir durante a contração muscular (Mayne e Sanderson, 1985).

Sabe-se que existem diferentes tipos de colágeno, sendo que as principais formas apresentadas no músculo esquelético são o I, III, IV e V (Mayne, 1982). Relata-se que no músculo esquelético têm-se principalmente os colágenos tipo I e II localizado no epimísio, perimísio e endomísio, enquanto que o tipo IV, está presente na membrana basal (Light e Champion, 1984).

Em estudo realizado por Jarvinen et al. (2002) observou-se no epímísio principalmente colágeno do tipo I e pequena quantidade do tipo III, no perimísio quantidade equivalente de colágeno do tipo I e III, enquanto que o endomísio apresentou maior quantidade de colágeno tipo III. Após período de três semanas de imobilização em posição encurtada observou-se que a quantidade de colágeno no epímísio não foi alterada, enquanto que no perimísio e endomísio observou-se aumento do colágeno tipo III.

No mesmo estudo de Jarvinen et al. (2002) avaliaram a orientação das fibras colágenas em músculo normal e imobilizado. De maneira geral, foram observadas no músculo normal fibras que correm em três direções, sendo: longitudinal, perpendicular (conectando fibras musculares adjacentes) e que correm ao redor de capilares e nervos intramusculares. Após período de imobilização observou-se que essas fibras aumentam em número e diâmetro, e a rede como um todo se torna mais densa e desorganizada, não sendo possível, algumas vezes, distinguir as diferentes orientações.

Han et al., (1999) e Ahtikoski et al. (2001) observaram diminuição de colágeno tipo I e III após período de imobilização. Da mesma forma, Ahtikoski et al. (2003) observaram degradação no colágeno tipo IV logo nos primeiros dias de imobilização.

Com relação aos grupos apenas submetidos a sessões de alongamento não foram observadas alterações significativas quando comparados ao grupo controle. Estudo realizado com imobilização em posição de alongamento mostra resultado semelhante, não havendo alteração na densidade de tecido conjuntivo após período de imobilização nesta posição (Williams e Goldspink, 1984).



Acredita-se, portanto, que não é a imobilização em si que provoca o aumento na densidade de tecido conjuntivo, mas sim a posição que o músculo é imobilizado. Segundo Tabary et al., (1972) o aumento de tecido conjuntivo no músculo imobilizado em posição de encurtamento tem como objetivo prevenir um estiramento ou alongamento excessivo, e o músculo imobilizado em posição alongada não é susceptível ao estiramento, uma vez que já se encontra em posição de grande alongamento.

### **6.5 Amplitude de movimento**

No primeiro dia de experimento todos os grupos experimentais apresentaram amplitude de movimento similar, não havendo diferença significativa entre eles, o que é justificado por se tratar de amostra homogênea com animais de mesma idade.

Após o período de imobilização observou-se redução média na amplitude de movimento do grupo imobilizado de 48%, quando comparado ao grupo controle. Trabalhos prévios mostram que a imobilização na posição de encurtamento resulta em diminuição da amplitude de movimento articular. Em estudo realizado por Williams (1988) observou-se redução média de 42% na ADM de animais imobilizados por dez dias. Okita et al. (2004) observaram redução de 22% na ADM após uma semana de imobilização e de 32% após duas semanas.

Sabe-se que a imobilização em posição de encurtamento leva, dentre outras alterações, à diminuição do número de sarcômeros em série, aumento na densidade de tecido conjuntivo intramuscular e alterações articulares, fatores estes, que influenciam a amplitude de movimento (Tabary et al., 1972; Williams e

Goldspink, 1984; Renner et al., 2006). No presente trabalho, foi observada diminuição no número de sarcômeros em série e aumento na densidade de tecido conjuntivo nos grupos imobilizados, o que justifica a diminuição da amplitude de movimento neste grupo.

Diversos trabalhos suportam a utilização do alongamento com o intuito de prevenir ou reverter os efeitos causados na amplitude de movimento pela imobilização em posição de encurtamento. Williams (1988) observou que animais imobilizados por 10 dias e alongados a cada dois dias, por 15 minutos retornaram seu valor de amplitude normal ao final do experimento. Em outro trabalho, Williams (1990) mostrou que o alongamento diário, aplicado durante 2 semanas, por 30 minutos, no músculo encurtado foi eficaz na manutenção da amplitude normal do tornozelo.

Entretanto, no presente trabalho, os animais submetidos à imobilização e posteriormente ao alongamento apresentaram redução na amplitude de movimento quando comparados ao grupo controle, sendo esta redução de 37% para o grupo IAC e de 50% para o IAI. Apesar dos protocolos de alongamento, contínuo e intermitente, mostrarem-se eficazes na manutenção do número de sarcômeros em série, ambos os grupos apresentaram aumento da densidade de tecido conjuntivo intramuscular, o que pode justificar a diminuição na amplitude de movimento nesses animais.

Além disso, deve-se considerar que os trabalhos de Williams (1988) e Williams (1990) utilizaram períodos menores de imobilização, 10 e 14 dias, enquanto que no presente estudo o sóleo foi mantido em posição de encurtamento por três semanas. Outra diferença observada é que nos trabalhos citados o alongamento foi iniciado concomitante a imobilização e durante todo

período de sua aplicação, enquanto que no presente estudo as sessões foram iniciadas após 14 dias de imobilização, podendo o animal apresentar encurtamento mais significativo, e realizadas apenas por uma semana, podendo este período insuficiente para levar a aumento da ADM.

Com relação aos grupos apenas submetidos a sessões de alongamento, não foram observadas alterações significativas na amplitude de movimento quando comparado ao grupo controle. Deve-se ressaltar que nestes grupos experimentais também não foram observadas alterações no número de sarcômeros em série e na densidade de tecido conjuntivo.

Entretanto, a avaliação intragrupo mostrou que todos os grupos experimentais apresentaram alteração significativa quando comparado seus valores iniciais e finais, sendo demonstrado aumento para os grupos C, AC e AI, e diminuição para os grupos I, IAC e IAI.

O aumento na amplitude de movimento no grupo controle pode ter sido causado pelo aumento da massa corporal, uma vez que os roedores permanecem constantemente em posição de grande dorsiflexão, e o aumento da massa corporal impõe maior carga sobre essa posição, agindo como estímulo de alongamento.

No entanto, apesar de não terem sido observadas diferenças entre os grupos controle e apenas alongados, observa-se que o aumento da amplitude de movimento nos grupos alongados apresenta valores médios maiores, sendo de  $6 \pm 5\%$  para o grupo C,  $14 \pm 6\%$  para o AC e  $18 \pm 6\%$  para o AI, o que poderia ser justificado pela aplicação diária de alongamento durante sete dias consecutivos.

Mesmo não havendo alterações significativas no número de sarcômeros em série e densidade de área de tecido conjuntivo nos grupos

apenas alongados, a aplicação dos protocolos poderia resultar em maior amplitude de movimento devido a aumento na tolerância ao alongamento ou até mesmo alterações qualitativas de tecido conjuntivo, fatores esses que influenciam a amplitude de movimento.

Ao analisarmos a variação da amplitude de movimento durante a aplicação do alongamento (figura 12) observa-se que o comportamento da ADM dos grupos AC e AI durante o período experimental foi similar, apresentando valores próximos entre eles, não demonstrando grandes alterações na resposta da ADM entre os protocolos contínuo e intermitente. Da mesma forma, os grupos IAC e IAI também apresentaram comportamento semelhante, isto é, ambos mostraram redução da ADM após a imobilização, que se manteve diminuída durante todo o período de aplicação do alongamento. No entanto, o grupo IAI apresentou valores médios menores que o IAC, sugerindo que possa existir adaptação distinta quando o músculo encurtado é submetido a protocolos de alongamento contínuo e intermitente.

## **6.6 Protocolo experimental**

Diversos fatores contribuíram para a utilização do músculo sóleo neste experimento. Dentre eles pode-se citar sua estrutura relativamente simples, fusiforme, com fibras que correm de tendão a tendão, apresentando dessa forma todos os tipos de fibra no seu ventre muscular (Williams e Goldspink, 1971), o que garante que a mensuração da área de secção transversa não tenha sido específica para um determinado tipo de fibra muscular.

Outra questão importante é o fato de se tratar de um músculo antigravitacional, com predomínio de fibras lentas e, sendo assim, apresentar perda de massa muscular mais acentuada quando submetido à imobilização (Caiozzo et al., 1996). Além disso, o sóleo é um músculo uniarticular, o que previne problemas biomecânicos da aplicação do alongamento; apresenta menor variação do número de sarcômeros por fibra quando comparado a outros músculos de animais da mesma idade; além de ser constantemente utilizado em estudos com o intuito de avaliar os efeitos da imobilização e alongamento, o que facilita a comparação dos resultados obtidos (Williams e Goldspink, 1976; Williams, 1988, Okita et al., 2001; Gomes et al., 2004; Mattiello-Sverzut et al., 2006; Gomes et al., 2007).

Com relação à idade dos animais, optou-se pelo uso de ratos adultos uma vez que neste período o processo de desenvolvimento muscular já terminou, sendo que com oito semanas de vida a adição do número de sarcômeros do sóleo de ratos já está completa (Williams e Goldspink, 1978). Além disso, sabe-se que animais jovens podem apresentar adaptações de tendão, além de tecido muscular, quando submetidos a protocolos de alongamento (Tardieu et al., 1977; Alnaqeeb, Zaid e Goldspink, 1984)

Já a utilização de um grupo controle, e não do membro contralateral como referência, deve-se ao fato de estudos prévios (Yang et al., 1997; Coutinho et al., 2004) mostrarem sinais de lesão e regeneração nos músculos contralaterais a imobilização, devido a uso excessivo e compensatório. Esses resultados permitiram aos autores concluir que o membro contralateral não pode ser considerado um controle apropriado.

O modelo de órtese utilizado mostrou-se eficiente para os objetivos desejados. Optou-se por sua utilização por se tratar de um recurso barato, de fácil manuseio e que permite o ajuste ao animal sempre que necessário. Estudo prévio mostrou que quando comparado ao modelo tradicional de imobilização, gesso, o modelo utilizado neste estudo apresenta menor perda de peso corporal, menor incidência de edema e úlceras cutâneas, além de custo reduzido (Coutinho et al., 2002).

Com relação ao tempo de imobilização utilizado, estudos realizados com o intuito de analisar os efeitos da imobilização no músculo esquelético mostraram que a imobilização em posição de encurtamento por apenas dois dias já é capaz de gerar alterações na força e massa muscular (Williams e Goldspink, 1971).

Williams e Goldspink (1984) observaram redução do número de sarcômeros em série e proliferação de tecido conjuntivo desorganizado após imobilização durante duas semanas. No entanto, optou-se por utilizar três semanas de imobilização uma vez que trabalhos realizados pelo mesmo período de imobilização em posição encurtada mostraram redução do peso muscular e corporal, do número de sarcômeros em série e da área de secção transversa (Coutinho et al., 2004; Gomes et al., 2004).

A maioria dos estudos realizados para avaliar os efeitos do alongamento no músculo esquelético tem como objetivo prevenir as conseqüências deletérias da imobilização (Williams, 1988; Williams et al., 1988; Williams, 1990; Coutinho et al., 2004; Mattiello-Sverzut et al., 2006; Gomes et al., 2007). Sendo assim, as sessões de alongamento tiveram início logo após o animal ser submetido à imobilização, algumas horas ou poucos dias depois. No

presente trabalho, buscou-se analisar o efeito da aplicação do alongamento depois de duas semanas da imobilização, tendo como finalidade avaliar se o alongamento seria capaz de interferir positivamente mesmo depois que as adaptações musculares decorrentes da imobilização já estivessem estabelecidas.

O protocolo de alongamento aplicado neste estudo apresentou, pelo menos, duas limitações: a não mensuração da força de aplicação de alongamento e a ausência do referencial de dor.

Sabe-se que a quantidade de força imposta no alongamento influencia a resposta muscular, uma vez que o músculo consiste em tecido viscoelástico e a quantidade de deformação depende, não somente, do tempo como também da força aplicada (Deyne, 2001). No entanto, para que a variação da aplicação da força fosse minimizada, respeitou-se sempre a resistência tecidual de cada animal. Uma vez atingida esta resistência, o alongamento era mantido e aumentado progressivamente sempre que houvesse diminuição do estresse viscoelástico.

Deve-se considerar que na prática clínica a maioria dos alongamentos são realizados manualmente e, portanto a aplicação da força também não é mensurada. Além disso, estudo prévio que utilizou protocolo intermitente também refere uso da resistência manual (Mattiello-Sverzut et al., 2006).

A segunda limitação consistiu na ausência do referencial de dor, que é fator importante para indicar a amplitude de movimento máxima a ser trabalhada durante as sessões de alongamento, sem que haja estresse excessivo para a unidade músculo-tendínea. Sabe-se que na prática clínica a dor é um dos principais fatores que determinam a amplitude de movimento a qual a articulação

será posicionada. No presente estudo determinou-se o grau de amplitude que o tornozelo do animal seria posicionado apenas por meio da resistência do tecido.

Outro fator que poderia influenciar na resposta muscular é a velocidade com que o movimento foi realizado até que se atingisse a máxima dorsiflexão. O alongamento estático pode ser dividido em duas fases principais: uma em que o músculo está aumentando o seu comprimento, conhecida como fase dinâmica, e outra na qual ele permanece estático com seu comprimento aumentado, conhecida como fase estática (Magnusson, Aagaard e Nielson, 2000). Estudos pilotos realizados em nosso laboratório mostraram que o tempo de 5 segundos era suficiente para a fase dinâmica, sendo, portanto, o tempo estipulado para a realização do estudo.

Embora existam diferenças entre os músculos de humanos e roedores, acredita-se que os resultados obtidos em experimentos com roedores possam trazer novas informações sobre a adaptação muscular após sessões periódicas de alongamento, fornecendo subsídios para a aplicação clínica.



## **7 CONCLUSÃO**

Conclui-se que a aplicação dos procedimentos de alongamento utilizados no estudo são estímulos eficazes para gerar adaptações musculares e que os diferentes protocolos, contínuo e intermitente, promovem adaptações musculares semelhantes para a maioria das variáveis, podendo ambos serem indicados na prática clínica.

## REFERÊNCIAS\*

Ahtikoski AM, Koskinen SOA, Virtanen P, Kovanen V, Takala TES. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand.* 2001; 171: 131-40.

Ahtikoski AM, Koskinen SOA, Virtanen P, Kovanen V, Ristelli J, Takala TES. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand.* 2003; 177(4): 473-81.

Alnaqeeb MA, Al Zaid NS, Goldspink G. Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. *J Anat.* 1984; 139(4): 677-89.

Alter MJ. *Ciência da flexibilidade.* São Paulo: Artmed; 1999. 365p.

Anderson B, Burke ER. Scientific, medical and practical aspects of stretching. *Clin Sports Med.* 1991; 10: 63-86.

Ansved T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand.* 1995; 154: 291-302.

---

\* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Antonio J, Gonyea WJ. Role of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia in intermittently stretched avian muscle. *J Appl Physiol.* 1993; 74(4): 1893-98.

Appel HJ. Muscular atrophy following immobilization. A review. *Sports Med.* 1990; 10(1): 42-58.

Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002; 81: 40-54.

Bandy WD, Irion JM. The effect of time on static stretch on the flexibility of the hamstring muscle. *Phys Ther.* 1994; 74: 845-50.

Bandy WD, Irion JM, Briggler M. The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. *Phys Ther.* 1997; 77(10): 1090-6.

Bandy WD, Irion JM, Briggler M. The effect of static stretch and dynamic range of motion training on the flexibility of the hamstring muscles. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998; 27(4): 295-300.

Bao ZZ, Lakonishok M, Kaufman SJ, Hornwitz AF. Alpha 7 beta 1 integrin is a component of the myotendinous junction on skeletal muscle. *J Cell Sci.* 1993; 106: 579-89.

Beaulieu JE. Developing a stretching program. *Phys Sport.* 1981; 9(11): 59-69.

Best TM, McElhaney J, Garret WE, Myers BS. Characterization of the passive responses of live skeletal muscle using the quasi-linear theory of viscoelasticity. *J Biomech.* 1994; 27: 413-19.

Best TM, Hasselman CT, Garret WE. Muscle strain injuries: biomechanical and structural studies. Oxford: Salmons S; 1997.

Bishopric NH, Javaseka V, Webster KA. Positive regulation of the skeletal  $\alpha$ -actin gene by fos and jun in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1992; 267: 25535-40.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001; 294(5547): 1704-08.

Booth FW. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1982; 52: 1113-18.

Borg TK, Caulfield JB. Morphology of connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell.* 1980; 12: 197-207.

Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, Herrick RE, Prietto N, Baldwin KM. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1996; 81(1): 123-32.

Caiozzo VJ, Utkan A, Chou R, Khalafi A, Chandra H, Baker M, et al. Effects of distraction on muscle length: mechanisms involved in sarcomerogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; 403S: 133-45.

Chandler TJ, Kibler WB, Uhl TL, Wooten B, Kiser A, Stone E. Flexibility comparisons of junior elite tennis players to other athletes. *Am J Sport Med.* 1990; 18(2): 134-36.

Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BS, McCabe TJ, McMillan, et al. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996; 93: 9142-47.

Cohen I, Bogin E, Chechik A, Rzetelny V. Biochemical alterations secondary to disuse atrophy in the rat's serum and limb tissues. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1999; 119: 410-17.

Corbin CB, Noble L. Flexibility: a major component of physical fitness. *J Phys Educ Rec.* 1980; 6: 23-60.

Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(11): 1329-32.

Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Oishi J, Salvini, TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(12): 1853-61.

Cros N, Miller J, Bouju S, Pletu G, Jacquet C, Leger JJ, et al. Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am J Physiol.* 1999; 276: 308-16.

Deyne PGD. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. *Phys Ther.* 2001; 81(2): 819-27.

Dix DJ, Eisenberg BR. Myosin mRNA accumulation and myofibrillogenesis at the myotendinous junction of stretched muscles. *J Cell Biol.* 1990; 111: 1885-94.

Edgerton VR, Roy RR, Allen DL, Monti RJ. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002; 81(11): 127-47.

Ettema GJ, Huijijng PA. Skeletal muscle stiffness in static and dynamic contractions. *J Biomech.* 1994; 27: 1361- 68.

Feland JB, Myrer JW, Schulthies SS, Fellingham GW, Measom GW. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. *Phys Ther.* 2001; 81(5): 1100-17.

Gajdosik RL. Flexibility or muscle length? *Phys Ther.* 1995; 75: 238-239.

Gajdosik RL. Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications. *Clin Biomech.* 2001; 16: 87-101.

Gajdosik RL, Bohannon RW. Clinical measurement of range of motion: review of goniometry emphasizing reliability and validity. 1987; 67: 1867-72.

Gamrin L, Berg HE, Essen P, Tesh PA, Hultman PJ, Garlick PJ, et al. The effect of unloading on protein synthesis in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1998; 163: 369-77.

Goldspink G. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1977; 264: 267-82.

Gomes ARS, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(10): 1473-80.

Gomes ARS, Cornachione A, Salvini TF, Mattiello-Sverzut AC. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. *J Anat.* 2007; 210: 328-35.

Griffiths PJ, Ashley CC, Bagni MA et al. Cross-bridge attachment and stiffness during isotonic shortening of intact single muscle fibers. *Biophys J.* 1993; 64: 1150-60.

Han XY, Wang W, Myllyla R, Virtanen P, Karpakka J, Takala TES. mRNA levels for  $\alpha$ -subunit of protol 4-hydroxylase and fibrillar collagens in immobilized rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1999; 87: 90-96.

Harjola VP, Jankala H, Harkonen M. Myosin heavy chain mRNA and protein distribution in immobilized rat skeletal muscle are not affected by testosterone status. *Acta Physiol Scand*. 2000; 169: 277-82.

Hill DK. Tension due to interaction between sliding filaments in resting striated muscle: the effect of stimulation. *J Physiol*. 1968; 199: 637-84.

Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. A physiological role for titin and nebulina in skeletal muscle. *Nature*. 1986; 323: 160-64.

Hudson NJ, Franklin CE. Preservation of three-dimensional capillary structure in frog muscle during aestivation. *J Anat*. 2003; 202: 471-74.

Huxley HE, Stewart A, Sosa H, Irving T. X-ray diffraction measurements of the extensibility of actin and myosin filaments in contracting muscle. *Biophys J*. 1994; 67: 2411-21.

Jarvinen TA, Józsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Jarvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002; 22(3): 245-54.



Kisner C, Colby LA. Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas. Barueri: Manole; 2005. 841p

Law DJ, Tidball JG. Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defects in pre-necrotic and fully regenerated skeletal muscle. *Am J Pathol.* 1993; 142: 1513-23.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function & plasticity. Baltimore: Lippincott Williams e Wilkins; 2002. 369p.

Light N, Champion AE. Characterization of muscle epimysion, perimysion and endomysion collagens. *Biochem J.* 1984; 219: 1017-26.

Lowe DA, Lund T, Always SE. Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails. *Am J Physiol.* 1998; 275(1): 155-62.

Magnusson SP. Passive properties of human skeletal muscle during stretch maneuvers. *Scand J Med Sci Sports.* 1998; 8: 65-77.

Magnusson SP, Aagaard P, Nielson JJ. Passive energy return after repeated stretches of the hamstring muscle-tendon unit. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32(6): 1160-64.

Mathieu O. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc.* 1980; 121(1): 75-88.

Mattiolo-Sverzut AC, Carvalho LC, Cornachione A, Nagashima M, Neder L, Shimano AC. Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. *Histol Histopathol.* 2006; 21: 957-64.

Mayne R. *Muscle*. New York: Churchill Livingstone; 1982.

Mayne R, Sanderson RD. The extracellular matrix of muscle. *Coll Rel Res.* 1985; 5: 449-68.

Mchugh MP, Magnusson SP, Gleim GW, Nicholas JA. Viscoelastic stress relaxation in human skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1992; 24: 1375-82.

Mujika I, Padilla S. Muscular characteristics of detraining in humans. *Med Sci Sports.* 2001; 33: 1297-303.

Oki S, Desaki J, Matsuda Y, Okumura H, Shibata T. Capillaries with fenestrae in the rat soleus muscle after experimental limb immobilization. *J Eletron Microsc.* 1995; 44: 307-10.

Okita M, Yoshimura T, Nakano J, et al. Effects of short duration stretching on disuse muscle atrophy in immobilized rat soleus muscles. *J Jpn Phys Ther Assoc.* 2001; 4: 1-5.

Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Motomura M, Eguchi K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in the rat soleus muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004; 25(2): 159-66.

Prentice WE. *Rehabilitation techniques in sports medicine.* Boston: MCB/McGraw Hill; 1999.

Proske U, Morgan DL. Do cross-bridges contribute to the tension during stretch of passive muscle? *J Muscle Res Cell Motil.* 1999; 20: 433-42.

Purslow PP. Strain-induced reorientation of an intramuscular connective tissue network: implications for passive muscle elasticity. *J Biomech.* 1989; 22: 221-312.

Renner AF, Carvalho E, Soares E, Mattiello-Rosa S. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14: 196-202.

Roberts JM, Wilson K. Effect of stretching duration on active and passive range of motion in the lower extremity. *Br J Sports Med.* 1999; 33(4): 259-63.

Rosário JLR, Marques AP, Maluf AS. Aspectos clínicos do alongamento: uma revisão da literatura. *Rev. Bras. Fisioter.* 2004; 8(1): 83-88.

Rowe RWD. Morphology of perimysial and endomysial connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell.* 1981; 13: 681-90.

Shah SB, Peters D, Jordan KA, Milner DJ, Fridén J, Capetanaki Y, et al. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol.* 2001; 204: 1703-10.

Shah SB, Su FC, Jordan K, Milner DJ, Fridén J, Capetanaki Y et al. Evidence for increased myofibrillar mobility in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol.* 2002; 205: 321-325.

Shah SB, Davis J, Weisleder N, Kostavassili I, McCulloch AD, Ralston E et al. Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. *Biophys J.* 2004; 86: 2993-3008.

Shrier I, Gossal K. Myths and truths of stretching. *Physician and sports medicine.* 2000; 28(8): 57-62.

Shear CR, Block RJ. Vinculin in subsarcolemmal densities in chicken skeletal muscle: localization and relationship to intracellular and extracellular structures. *J Cell Biol.* 1985; 101: 240-56.

Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res.* 2000; 302: 235-41.

Starring DT, Gossman MR, Nicholson GGJ, Lemons J. Comparison of cyclic and sustained passive stretching using a mechanical device to increase resting length of hamstring muscles. *Phys Ther.* 1988; 68(3): 314-20.

Street SF. Lateral transmission of tension in frog myofibers: a myofibrillar network and transverse cytoskeletal connections are possible transmitters. *J Cell Physiol.* 1983; 114: 346-64.

Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol.* 1972; 224: 231-44.

Takezawa Y, Sugimoto Y, Wakabayashi K. Extensibility of actin and myosin filaments in various status of skeletal muscle as studied by X-ray diffraction. *Adv Exp Biol.* 1998: 309-16.

Tardieu C, Tabary JC, Huet E, Tabary C, Tardieu G. The relationship between sarcomere length in the soleus and tibialis anterior and the articular angle of the tibia-calcaneum in cats during growth. *J Anat.* 1977; 124(3): 581-88.

Tidball JG. Desmin at myotendinous junctions. *Exp Cell Res.* 1992; 199: 206-212.

Vesco JJ. *Current Therapy in Sports Medicine*. Toronto: BC Decker; 1990.

Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R. Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: A test of the segmental extension model of resting tension. *Proceedings of the national academy of science (USA)*. 1991; 88(6): 7101-105.

Warren CG, Lehmann JF, Koblanski JN. Elongation of rat tail tendon: effect of load and temperature. *Arch Phys Med Rehabil*. 1971; 57(3): 122-26.

Webright WG, Randolph BJ, Perrin DH. Comparison of nonballistic active knee extension in neural slump position and static stretch techniques on hamstring flexibility. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1997; 26(1): 7-13.

Williams PE. Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1988; 47: 1014-16.

Williams PE. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1990; 49: 316-17.

Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat*. 1988; 158: 109-14.

Williams PE, Goldspink G. Longitudinal growth of striated muscle fibers. *J Cell Sci.* 1971; 9(3): 751-67.

Williams PE, Goldspink G. The effect of denervation and dystrophy on the adaptation of sarcomere number to the functional length of the muscle in young and adult mice. *J Anat.* 1976; 122: 455-65.

Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *J Anat.* 1978; 127(3): 459-68.

Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilised muscle. *J Anat.* 1984; 138(2): 343-50.

Wilmore JH. The aging of bone and muscle. *Clin Sports Med.* 1991; 10(2): 231-44.

Woo SLY, Young EP. Structure and function of tendons and ligaments. *Basic Orthopaedic Biomechanics.* New York: Raven Press; 1991. 199-124.

Yang H, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. *J Anat.* 1997; 190(4): 613-22.

Zarzhevsky N, Coleman R, Volpin G, Fuchs D, Stein H, Reznick A. Muscle recovery after immobilization by external fixation. *J Bone Joint Surg.* 1999; 81B: 896-901.

