

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Adaptações do músculo sóleo previamente encurtado após aplicação de
alongamento associado a recursos térmicos

Fábio Augusto Facio

2007

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FÁBIO AUGUSTO FACIO

Adaptações do músculo sóleo previamente encurtado após aplicação de alongamento associado a recursos térmicos

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: Prof^a. Dr^a. Viviane Balisardo Minamoto

PIRACICABA
2007

Ficha Catalográfica

Facio, Fábio Augusto

Adaptações do músculo sóleo previamente encurtado após aplicação de alongamento associado a recursos térmicos. Piracicaba, 2007.

98p.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Viviane Balisardo Minamoto

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

1. Imobilização. 2. Alongamento. 3. Recursos Térmicos. 4. Sarcômero. 5. Morfometria muscular. I. Minamoto, Viviane Balisardo. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais: Ilka e Carlos, pelo apoio incondicional, amor e paciência.

Agradecimentos

Aos meus pais, pela vida, amor, carinho, atenção e por abrir as portas diante de todas as oportunidades.

À minha querida irmã e cunhado.

Aos meus amigos de todos os lugares e para todas as horas.

Aos amigos e irmãos da República Sinapse, pela aprendizagem conjunta e diversão.

Aos amigos do mestrado, pela ajuda e convivência.

À Carol, pela ajuda nos dias mais difíceis do experimento.

À minha amiga e parceira de graduação e mestrado, Giovanna. Sem ela o trabalho seria duplicado! Muito obrigado pela ajuda e companhia nestes 6 anos de convivência.

À minha orientadora Vivi, pela ajuda, transmissão de conhecimento e confiança desde a época da graduação.

À Marcela, Thaysa e todos os alunos da graduação que nos ajudaram na realização do experimento.

Aos funcionários da UNIMEP, em especial ao Celsão e Marcão dos laboratórios de Fisioterapia, à Aninha e Cris do laboratório de Química e à Miriam.

Aos membros da banca examinadora, Prof^o Dr^o Rinaldo Guirro, Prof^a Dr^a Maria Luiza Polacow e Prof^a Dr^a Anna Raquel Silveira pela disposição, interesse e contribuição para a versão final da dissertação.

À Prof^a Dr^a Rosana Macher pela colaboração na dissertação, compreensão e convivência no laboratório.

À Prof^a Dr^a Maria Imaculada Montebelo pela colaboração com a análise estatística.

À Prof^a Dr^a Tânia Salvini, por permitir o uso do Laboratório de Plasticidade Muscular da Universidade Federal de São Carlos.

Aos professores da UNIMEP, pela disposição em todos os momentos necessários.

À CAPES/Prosup.

RESUMO

O alongamento é utilizado para prevenir e/ou reverter as alterações musculares causadas pelo encurtamento muscular. A associação do alongamento ao frio ou calor é empregada na prática clínica para tornar o mesmo mais efetivo, embora não há estudos relatando os efeitos desse procedimento nas adaptações de sarcômero e morfometria muscular. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da associação de frio ou termoterapia ao protocolo de alongamento em músculo previamente encurtado. Ratos machos *Wistar* foram divididos em grupos Controle (C); Imobilizado (I); imobilizado + alongamento (A); imobilizado + gelo + alongamento (G); e imobilizado + infra-vermelho + alongamento (IV). Os animais tiveram o tornozelo imobilizado em flexão plantar máxima por um período de 21 dias. O alongamento passivo foi realizado diariamente a partir do 15º dia de imobilização por um período de 40 minutos, durante sete dias. A aplicação dos recursos físicos foi realizada simultaneamente ao alongamento. No 22º dia do experimento os animais tiveram o músculo sóleo retirado, pesado e processado para avaliação da área de secção transversa (AST) das fibras, da densidade do tecido conjuntivo (TC) e das adaptações de sarcômero. A amplitude de movimento (ADM) foi mensurada no primeiro e último dia da aplicação do alongamento. Análise estatística: ANOVA F seguido de Pos hoc Tukey e Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($p < 0,05$). Os animais do grupo C obtiveram ganho de peso corporal, enquanto que os animais dos grupos I, A, IV e G apresentaram perda do mesmo. Com exceção do grupo A, todos os outros grupos apresentaram massa muscular significativamente menor quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$). Todos os grupos submetidos a imobilização e/ou protocolos de alongamento apresentaram, no final do experimento, menores valores de ADM em relação ao grupo C ($p \leq 0,0001$). Entre os grupos alongados, o grupo A apresentou maior ADM quando comparado aos grupos IV e G ($p \leq 0,04$). O grupo I apresentou adaptações do número e extensão do sarcômero e do comprimento muscular quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,0009$). O grupo A apresentou valores de comprimento muscular e extensão de sarcômero semelhante ao C, sendo que o número de sarcômeros foi maior em todos os grupos submetidos ao alongamento, quando comparado ao grupo I ($p \leq 0,0006$). Com exceção do grupo A, todos os outros grupos apresentaram valores de AST menores que o grupo C ($p \leq 0,002$). Além disso, o grupo A apresentou valor de AST maior do que os grupos I, IV e G ($p \leq 0,00001$). Todos os grupos imobilizados e tratados apresentaram maiores valores de densidade de TC quando comparados ao grupo C ($p \leq 0,003$), sendo o grupo G o que apresentou valor mais próximo do grupo C. Embora a adaptação de sarcômero pareça não ser dependente do aquecimento e resfriamento muscular, a alteração na densidade de TC mostrou-se responsiva ao alongamento associado ao resfriamento, enquanto a área de secção transversa das fibras respondeu com adaptações apenas ao alongamento sem associação de recursos térmicos.

Palavras Chave: Imobilização, Alongamento, Recursos Térmicos, Sarcômero, Morfometria muscular

ABSTRACT

Stretching is a common technique used to prevent and/or revert the muscular alterations caused by muscular shortening. The association of stretching to cold or heat is used in the practical clinic to improve the efficiency of stretching, although there are no studies showing the effect of this procedure in sarcomere adaptations and muscular morphology. The aim of this study was to compare the effect of the association of cryotherapy or thermotherapy to stretch protocol. Male Wistar rats were divided into Control (C); Immobilized (I); immobilized + stretching (A); immobilized + ice + stretching (G); immobilized + infra-red ray + stretching (IV) groups. The animals had the ankle immobilized in maximum plantar flexion for a period of 21 days. The passive stretch was carried daily, beginning on day 15th after immobilization, for a period of 40 minutes, during 7 days. The application of ice and infra-red ray was applied simultaneously to the stretching. On the 22th day of the experiment the soleus muscle was removed, weighed and processed for evaluation of muscle fiber cross-sectional area (CSA), connective tissue (CT) density and sarcomere adaptation. The range of motion (ROM) was measured in the first and last day of the stretching. Statistic Analysis: ANOVA F followed of Pos hoc Tukey, and Kruskal-Wallis followed by Dunn ($p < 0,05$). The animals of the C group showed an increase in body weight, whereas the animals of I, A, IV and G groups showed loss of it. With exception of the A group, all the other groups showed significantly decrease in muscle mass when compared to C group ($p < 0,05$). All groups submitted to immobilization and/or stretching protocol showed, at the end of the experiment, lower values of ROM in relation to C group ($p \leq 0,0001$). The A group presented higher ROM compared to IV and G groups ($p \leq 0,04$). The animals of the I group showed sarcomere adaptation when compared to the C group ($p \leq 0,0009$). The A group presented values of muscle and sarcomere length similar to the C group, and the sarcomere number was increased in all groups submitted to the stretch, when compared to the I group ($p \leq 0,0006$). All groups, but the A one, presented lower values of AST than C group ($p \leq 0,002$). Moreover, the A group showed greater values of AST than I, IV and G groups ($p \leq 0,00001$). All the immobilized and treated groups showed increased values of CT density than C group ($p \leq 0,003$). Moreover, group G presented decreased value of CT density than I, A and IV groups ($p \leq 0,003$). Although the sarcomere adaptation seems not to be dependent on muscular heating and cooling, the change in connective tissue density has been responsive only to the lengthening associated with cooling, while the cross-sectional area suffered adaptations to stretch only when applied without combination of thermal features.

Key Words: Immobilization, Stretching, Thermal resource, Sarcomere, Muscular morphology

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
	2.1 Estrutura Muscular	12
	2.2 Tecido Conjuntivo	14
	2.3 Resposta muscular à imobilização	16
	2.4 Alongamento Muscular	20
	2.5 Flexibilidade	23
	2.6 Viscoelasticidade	28
	2.7 Resposta Muscular ao Calor e Frio	32
3	OBJETIVO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
	4.1 Animais e Grupos Experimentais	38
	4.2 Imobilização	39
	4.3 Procedimento de Alongamento	40
	4.4 Alongamento Associado à Aplicação de Frio e Calor	41
	4.5 Mensuração da Amplitude de Movimento	43
	4.6 Preparação e Análise Muscular	45
	4.7 Análise Estatística	50
5	RESULTADOS	51
	5.1 Massa Corporal	51
	5.2 Massa Muscular	52
	5.3 Amplitude de Movimento Inicial e Final	54

5.4	Variação da Amplitude de Movimento	55
5.5	Comprimento Muscular	56
5.6	Número de Sarcômeros em Série	57
5.7	Extensão do Sarcômero	58
5.8	Área de Secção Transversa	59
5.9	Densidade de Tecido Conjuntivo	60
6	DISCUSSÃO	61
6.1	Protocolo Experimental	61
6.2	Massa Corporal	63
6.3	Massa Muscular	64
6.4	Amplitude de Movimento	66
6.5	Adaptações do Sarcômero	70
6.6	Área de Secção Transversa	73
6.7	Densidade do Tecido Conjuntivo	76
7	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético possui extraordinária habilidade de reestruturar-se metabólica e estruturalmente, adaptando-se a diferentes estímulos aplicados a ele (Lieber, 2002).

Um exemplo desta adaptação pode ser observado após a imobilização muscular. A imobilização de um músculo na posição encurtada levará a diminuição da síntese protéica, do número de sarcômeros em série, atrofia da fibra muscular e proliferação do tecido conjuntivo, levando a redução da amplitude de movimento articular (Williams e Goldspink, 1978; Spector et al., 1982; Ansved, 1995).

Muitos estudos mostram a importância do alongamento como fator determinante para prevenir e/ou reverter as alterações causadas pelo encurtamento muscular (Williams, 1990; Goldspink, 1999; Gomes et al., 2004). O alongamento é capaz de promover aumento na extensibilidade muscular, tendo ação nas fibras musculares e tecido conjuntivo que as envolvem (De Deyne, 2001).

O calor tem sido bem aceito como recurso para aumentar a amplitude de movimento devido a sua função fisiológica de aumento da extensibilidade do colágeno e do fluxo sanguíneo, diminuição da percepção de dor e dos espasmos musculares (Halvorson, 1990; Prentice, 2002). Outras pesquisas mostram que o frio também é efetivo no aumento da mobilidade articular, sendo este causado pela diminuição da dor e do espasmo muscular (Olson e Stravino, 1972;

Prentice, 2002).

Deste modo, a associação de frio e calor com técnicas de alongamento é tema de vários estudos (Minton, 1993; Taylor, Waring e Brashear, 1995), entretanto os resultados encontrados são adversos. Além disso, estes estudos utilizaram a goniometria para avaliação do efeito do alongamento no músculo, sendo esta uma medida subjetiva da condição muscular, não sendo encontrado na literatura os efeitos da associação do alongamento com recursos térmicos na morfologia do músculo esquelético e adaptações do sarcômero.

Com base no exposto, torna-se importante avaliar as adaptações musculares após aplicação de alongamento associado a recursos térmicos em músculo previamente encurtado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.8 Estrutura Muscular

O músculo esquelético consiste de um dos tipos de células mais ordenados e estruturalmente especializados, sendo esta característica importante devido a sua função altamente especializada para produção de força e movimento (Alter, 1999; Lieber, 2002).

O tecido classificado como músculo esquelético consiste de fibras musculares (miofibras) alongadas e de forma cilíndrica. A miofibrila encontra-se envolvida pelo tecido conjuntivo chamado endomísio. Os feixes de miofibras formam os fascículos que são envoltos pelo perimísio, sendo o conjunto de fascículos circundados por uma bainha de tecido conjuntivo denominada epimísio (Purslow, 2002; Okita et al., 2004).

As miofibras consistem de milhares de miofibrilas que são compostas de sarcômeros organizados em série, os quais são os mecanismos contráteis do músculo (Alter, 1999).

Os sarcômeros medem aproximadamente 2.3 μm de comprimento e repetem-se em um padrão específico em cada miofibrila. São compostos por filamentos protéicos finos e grossos e apresentam um limite na extremidade que é chamado de banda-Z. Assim, o segmento entre duas bandas-Z é representado pelo sarcômero, a unidade funcional de uma miofibrila. Em alta resolução, a linha Z tem aparência de ziguezague e isso ocorre porque os filamentos finos de

cada lado da linha Z não são colineares, ou seja, os filamentos de actina de um sarcômero se unem a linha Z em pontos diferentes que os filamentos adjacentes. Essa configuração permite considerável variação no diâmetro miofibrilar, aumentando ou diminuindo a separação lateral entre os filamentos. Essa maleabilidade estrutural pode, possivelmente, contribuir para a elasticidade dos músculos (Smith, Weiss e Lehmkuhl 1997).

Além disso, o sarcômero é composto por mais quatro bandas. A banda-I contém filamentos de actina, titina e pontes-I. A banda-A corresponde ao comprimento dos filamentos de miosina e o centro desta é ocupado pela zona-H, que define as extremidades dos filamentos de actina. Por fim, existe a linha-M encontrada no centro do sarcômero e que corresponde a várias pontes-M (Alter, 1999).

O filamento fino possui, além da actina, outros componentes protéicos, como a nebulina, troponina e tropomiosina, que são responsáveis por regular a ligação dos filamentos. Já o filamento grosso, miosina, apresenta numerosas projeções laterais que se estendem na direção dos filamentos de actina formando as pontes cruzadas, responsáveis pela tensão muscular (Alter, 1999).

Os filamentos de actina e miosina possuem propriedades elásticas reduzidas que limitam a extensibilidade muscular (Gajdosik, 2001). Segundo a teoria do filamento deslizante original, os filamentos finos e grossos simplesmente movem-se ou deslizam um sobre o outro, variando o grau de sobreposição durante o alongamento. Entretanto, durante a mudança no

comprimento do sarcômero os filamentos de actina e miosina mantêm seu tamanho original (Alter, 1999). Além disso, os filamentos permanecem unidos por pontes cruzadas que influenciam na extensibilidade passiva de um músculo (Hill, 1968).

Um outro filamento de importância para o sarcômero é a titina, um filamento conectivo que se estende da linha-Z até a linha-M, ou seja, do final ao centro do sarcômero. A titina pode ser dividida em duas regiões: uma que se encontra na banda I e outra que se encontra na banda A, sendo a primeira mais maleável enquanto que a segunda encontra-se firmemente ligada aos filamentos grossos, ocasionando maior rigidez ao filamento de titina nesta porção (Lieber, 2002).

Já a desmina, outra proteína presente no sarcômero, é o principal filamento intermediário do músculo esquelético e provê um suporte ao citoesqueleto sarcomérico que permite transmissão de força eficiente de uma miofibrila para a adjacente (Lieber, 2002).

Como as fibras musculares possuem íntima relação com o tecido conjuntivo intramuscular, o comportamento elástico é também determinado pelas estruturas do tecido conjuntivo (Józsa et al., 1990).

2.9 Tecido Conjuntivo

O tecido conjuntivo intramuscular, composto por matriz extracelular, desempenha papel importante na estrutura muscular, pois circunda as fibras e

fascículos mantendo-os unidos, contribuindo assim para a transmissão de força durante a contração muscular (Jarvinen et al., 2002).

As células mais comuns encontradas nesse tecido são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras importantes para o sistema músculo esquelético, como as de colágeno e elastina. Os colágenos desempenham papel extremamente importante na manutenção da integridade estrutural do músculo e, além disso, são responsáveis pela resistência à tensão (Dutton, 2006).

Como citado anteriormente, miofibras, feixes e fascículos musculares são envoltos por tecido conjuntivo. Atualmente são conhecidos 19 tipos de colágeno (Takala e Virtanen, 2000), com predomínio do tipo I no epimísio que é mais tolerante ao estresse e apresenta alta força tênsil e elasticidade reduzida, sendo, portanto, o mais adaptado para a transmissão de força. O colágeno tipo III predomina no perimísio e endomísio (Salonen et al., 1985), apresentando fibras com maior elasticidade e menor espessura (Han et al., 1999).

Ao contrário do sarcômero, a fibra colágena apresenta apenas um leve grau de extensibilidade, podendo chegar a uma extensão de aproximadamente 3% (Ramachandran, 1967, citado por Alter 1999). A extensão do colágeno ocorre inicialmente através de um ajustamento das fibras e um deslizamento gradual de uma fibra em relação à outra, resultando em um ajuste do elo intermolecular e aumento da resistência ao alongamento adicional. Se houver continuidade no alongamento, será alcançado um ponto em que todas as forças intermoleculares são superadas e o tecido se rompe (Weiss e Greep,

1983).

Quando uma articulação é imobilizada ocorrem alterações na estrutura química do tecido conjuntivo, como diminuição do volume de água e glicosaminoglicanas, o que provoca diminuição da distância ideal entre as fibras colágenas. Em consequência disso, as fibras do tecido conjuntivo entrarão em contato umas com as outras estabelecendo ligações cruzadas anormais, resultando na perda da extensibilidade e um aumento na rigidez do tecido (McDonough, 1981).

O colágeno é, em parte, responsável pela flexibilidade muscular devido à organização de suas fibras (Kjaer, 2004), tornando-se necessário manter a densidade do tecido conjuntivo adequada no músculo, já que tanto o excesso quanto a diminuição desta proteína acarretam prejuízos na função muscular.

2.10 Resposta muscular à imobilização

A imobilização articular tem sido utilizada há muitos anos para o tratamento de fraturas ósseas e tecidos lesados. Entretanto, a imobilização traz várias alterações ao músculo esquelético, já que este é um dos tecidos mais adaptáveis do corpo (Lieber, 2002). Por esse motivo, inúmeros experimentos foram realizados para o estudo da resposta muscular à imobilização.

Em 1972, Tabary e colaboradores realizaram experimentos com músculo sóleo de gatos imobilizando-os em diferentes comprimentos

musculares, e observaram que a posição encurtada resulta em um aumento da resistência muscular ao alongamento passivo.

Williams e Goldspink (1978) e Williams (1990) mostraram que ocorre diminuição do número de sarcômeros em série, atrofia muscular e proliferação de tecido conjuntivo em animais que tiveram o músculo sóleo imobilizado na posição encurtada por três semanas.

Em outro estudo realizado por Williams e Goldspink (1984) foi possível observar diminuição do número de sarcômeros em série, além do aumento do tecido conjuntivo intramuscular, com conseqüente aumento da rigidez muscular, em apenas duas semanas de imobilização do músculo sóleo de animais na posição encurtada.

Para determinar as diferenças da resposta muscular à imobilização em posições variadas, Spector e colaboradores (1982) realizaram experimentos em músculo sóleo de animais e observaram aumento do tecido conjuntivo intramuscular somente quando o músculo era imobilizado na posição de encurtamento.

Kannus e colaboradores (1998) observaram que a imobilização na posição de encurtamento do músculo sóleo por sete dias resultou em diminuição da massa muscular em 37%. Já Gamrin e colaboradores (1998) e Williams e Goldspink (1971) observaram diminuição da massa muscular nas primeiras 48h de imobilização, além de diminuição da força muscular neste mesmo período.

Esta diminuição da massa muscular é resposta desencadeada pelo músculo que permanece em desuso por um longo período, quando a taxa de

degradação de proteínas contráteis ocorre mais rapidamente que a taxa de síntese, resultando na hipotrofia muscular. Deste modo, a hipotrofia é caracterizada por uma perda de massa muscular, que usualmente envolve diminuição na área de secção transversa das miofibras (Grounds, 2002).

A hipotrofia da fibra muscular, aumento do tecido conjuntivo, diminuição da extensibilidade muscular e limitação de movimento foram alterações encontradas por Williams et al. (1988), em experimento realizado com o músculo sóleo de coelhos imobilizados na posição encurtada por um período de sete dias.

Coutinho e colaboradores (2004), após imobilização do músculo sóleo de ratos na posição encurtada por três semanas, observaram diminuição do peso corporal e muscular, do comprimento muscular, do número de sarcômeros em série, da área de secção transversa e um aumento no comprimento do sarcômero.

Baseado nos experimentos relatados na literatura é possível observar que o músculo sofre várias alterações quando imobilizado na posição de encurtamento, sendo elas: diminuição da síntese protéica, número de sarcômeros em série (Williams e Goldspink, 1978), comprimento muscular (Coutinho et al., 2004), amplitude de movimento (Williams et al., 1988), força muscular (Gamrin et al., 1998), peso corporal e muscular (Coutinho et al., 2004) e área de secção transversa (Gomes et al., 2004), além de um aumento da rigidez muscular (Tabary et al., 1972), do comprimento do sarcômero (Coutinho et al., 2004) e da densidade do tecido conjuntivo (Williams, 1990).

Como o comprimento dos filamentos de actina e miosina são constantes, a adaptação do músculo para um comprimento funcional diferente ocorre por meio da alteração do número de sarcômeros em série, com o intuito de manter o correto comprimento do sarcômero em relação ao músculo como um todo (Tabary et al., 1972; Goldspink, 1976), sendo essa uma resposta miogênica à quantidade de tensão passiva a qual o músculo está submetido (Goldspink, 1974; Goldspink, 1976; Williams e Goldspink, 1976). Dessa forma, o músculo teria condições de gerar tensão máxima mesmo em sua nova posição e comprimento.

Goldspink e Williams (1979) mostraram que a imobilização resultou em um aumento na quantidade de tecido conjuntivo. Além disso, Williams e Goldspink (1984) relataram que as fibras de colágeno no músculo imobilizado estavam ajustadas em um ângulo mais agudo que as fibras musculares de músculos normais, o que resulta na diminuição da extensibilidade muscular.

Contudo, Tabary e colaboradores (1972), Goldspink (1976) e Goldspink e Williams (1979) sugerem que a diminuição da extensibilidade previne o músculo de ser super alongado subitamente, já que o alongamento em um músculo encurtado poderia romper com as interdigitações entre actina e miosina, lesando permanentemente o músculo.

A diminuição de pesos corporal e muscular está, provavelmente, relacionada com o desuso e hipotrofia muscular causada pela imobilização que poderia ter levado o animal a se alimentar menos pela dificuldade na movimentação, pela diminuição da síntese protéica como resposta à

hipoatividade ou pelo estresse causado pela imobilização (Coutinho et al., 2004).

2.11 Alongamento Muscular

Uma questão importante para reabilitação muscular é como prevenir os efeitos deletérios da imobilização sobre o músculo esquelético.

Muitos estudos têm relatado a importância do alongamento como forma de prevenir ou até mesmo reverter as alterações causadas pela imobilização na posição encurtada (Williams, 1990; Goldspink, 1999; Gomes et al., 2004). O alongamento é conhecido também como um importante aspecto de condicionamento físico amplamente usado no tratamento e prevenção de lesões, sendo, portanto, uma ferramenta importante na reabilitação física.

Williams (1988), realizou experimento em músculo sóleo de animais que foram apenas imobilizados na posição encurtada e outro grupo de animais que foram imobilizados e alongados a cada dois dias por meio da dorsiflexão máxima por 15 minutos. Após 10 dias de experimento, foi possível observar que a amplitude de movimento era significativamente maior no grupo alongado que no grupo apenas imobilizado, a taxa de tecido conjuntivo no grupo alongado não sofreu alterações significativas comparadas com grupo controle, e com relação ao número de sarcômeros em série não houve diferenças significativas quando comparado o grupo imobilizado com o grupo imobilizado e alongado. Foi encontrado, portanto, que o tratamento preveniu alterações no tecido conjuntivo, mas não impediu a redução no comprimento da fibra muscular.

Em outro experimento, Williams (1990) aplicou alongamento diário de 1/4h, 1/2h, 1h e 2h, em diferentes grupos de animais imobilizados na posição de encurtamento. Após duas semanas de experimento, foi observado que o grupo que recebeu alongamento de 1/4 h obteve aumento na amplitude de movimento e pequena perda de sarcômeros em série. Nos grupos em que o alongamento teve período de 1/2h e 1h houve manutenção da amplitude de movimento normal e prevenção da perda de sarcômeros em série. Já com o alongamento de 2h ocorreu aumento de 10% no número de sarcômeros.

Com intuito de entender como o tecido conjuntivo responde aos efeitos do alongamento e da contração muscular, Williams et al. (1988) aplicaram protocolo de alongamento e estimulação elétrica em músculo previamente encurtado. O grupo de animais submetido à estimulação apresentou perda mais acentuada no número de sarcômeros em série, mas não apresentou alterações no tecido conjuntivo. Já o grupo alongado mostrou aumento no número de sarcômeros em série e nenhuma alteração no tecido conjuntivo. Portanto, o acúmulo de tecido conjuntivo que ocorre em músculos inativos pode ser prevenido por estimulação ativa ou alongamento passivo. Além disso, foi concluído que a diminuição de sarcômeros em série ocorre também em músculos que trabalham em amplitude reduzida de movimento, como na associação da imobilização e estimulação elétrica.

Em estudo realizado com alongamento intermitente no músculo grande dorsal de aves, Antônio e Gonyea (1993) observaram que houve aumento na área da fibra muscular para todos os períodos utilizados em seu

experimento, ou seja, 12, 16, 20, 24 e 28 dias de alongamento. Portanto, o alongamento pode induzir também a hipertrofia das fibras musculares.

A hipertrofia, que é caracterizada por um aumento na massa muscular e da área de secção transversa (Russel et al., 2000), resulta, na maioria dos casos, de um aumento no número de filamentos de actina e miosina em cada fibra muscular. Este aumento dos elementos contráteis ocorre, geralmente, em resposta a contração muscular próxima de sua força máxima. Quando o músculo é alongado ocorre um acúmulo de RNAm de miosina oxidativa lenta na terminação das fibras. Esse acúmulo de RNAm está relacionado com a síntese de proteínas contráteis, na rápida união de sarcômeros e na determinação da extensão das miofibrilas (Dix e Eisenberg, 1990). O efeito do alongamento na síntese protéica também foi observado por Goldspink (1977).

Coutinho e colaboradores (2004) compararam grupos de animais que tiveram o músculo sóleo imobilizado na posição encurtada por três semanas com grupo de animais que foram imobilizados e submetidos a procedimento de alongamento por 40 minutos a cada três dias. Não foi possível observar diferenças significativas em relação ao comprimento muscular e número de sarcômeros em série entre os grupos, contudo os animais submetidos ao alongamento apresentaram redução da atrofia.

Em 2004, Gomes e colaboradores mostraram que o alongamento realizado apenas uma vez por semana, durante 40 minutos, em músculo sóleo de animais imobilizados pelo período de três semanas na posição encurtada não foi eficiente para prevenir a redução do peso muscular e do número de

sarcômeros em série, mas promoveu proteção contra a atrofia da fibra muscular. Os autores sugerem que o alongamento muscular regula o número de sarcômeros em série e a área de secção transversa por mecanismos diferentes.

Outros estudos de Goldspink (1999) e Goldspink, Williams e Simpson (2002) também mostraram a importância do alongamento na prevenção da proliferação do tecido conjuntivo, atrofia da fibra muscular e perda de sarcômeros em série de músculos imobilizados.

Um programa de alongamento progressivo e intenso, no qual o movimento excede a amplitude de movimento possível, resultará em adaptações do sistema músculo-esquelético levando ao aumento da flexibilidade, que é simplesmente um resultado do alongamento.

2.12 Flexibilidade

A palavra flexibilidade é derivada do latim *flectere*, que significa curvar-se. Na área da saúde, flexibilidade refere-se a extensibilidade dos tecidos periarticulares para permitir movimento normal ou fisiológico de uma articulação ou membro (Alter, 1999).

Existem outras definições para flexibilidade, como a capacidade de uma articulação para mover-se com fluidez em sua máxima amplitude de movimento (Heyward, 1984), ou ainda a habilidade de um músculo para relaxar e ceder a uma força de alongamento (Kisner e Colby, 1992). Uma maneira de

mensurar a flexibilidade é por meio da goniometria, que é a mensuração da amplitude de movimento da articulação (Alter, 1999).

Um componente importante que permite a obtenção da amplitude máxima de movimento é a extensibilidade passiva, definida como a habilidade do músculo esquelético em alongar-se permitindo um comprimento muscular máximo, com ou sem ativação muscular (Gajdosik, 2001).

Quando um músculo em repouso é passivamente alongado, é produzida uma resistência pela propriedade passiva, o que influencia na extensibilidade passiva. Os fatores responsáveis por essa resistência podem ser a tensão de repouso filamentar produzida pelas pontes cruzadas de actina e miosina ou pela resistência dos próprios filamentos; o alongamento de proteínas não contráteis como a desmina e titina, bem como a deformação do tecido conjuntivo existente no músculo (Gajdosik, 2001).

Os filamentos de actina e miosina encontram-se unidos por pontes cruzadas, entretanto, o estado de ligação entre eles depende do grau de contração muscular. Quando o músculo encontra-se relaxado, em repouso, o estado de ligação é considerado fraco, já durante a contração muscular ocorre uma forte ligação entre os filamentos de actina e miosina. Desta forma, o estado de ligação entre os filamentos ou o grau de contração muscular influenciam na extensibilidade passiva, sendo observado respostas distintas na resistência passiva ao alongamento dependente do estado de contração e comprimento do sarcômero (Proske e Morgan, 1999).

Sabe-se que os filamentos de actina e miosina apresentam propriedades elásticas reduzidas, e durante a mudança no comprimento do sarcômero os filamentos mantêm seu tamanho original, contribuindo para a limitação na extensibilidade passiva (Alter, 1999).

A titina, outra proteína responsável pela resistência passiva ao alongamento, está em uma posição para produzir tensão de repouso e fornecer força que tende a centralizar os filamentos grossos dentro do sarcômero (Horowitz, 1992). Em uma situação de alongamento, a região da titina ligada aos filamentos grossos comporta-se rigidamente, enquanto que a região da molécula que se encontra na banda I é elástica e contribui para o comprimento aumentado do sarcômero (Furst et al., 1988; Itoh et al., 1988). As muitas isoformas de titina possuem tamanho e comprimento variados, determinando assim quando os sarcômeros irão desenvolver tensão de repouso sob alongamento e onde o sarcômero irá ceder por estresse.

Wang et al. (1991) mostraram que enquanto o sarcômero estende-se, o segmento extensível de titina é sensível a este deslocamento por meio de seu alongamento. Com o aumento do alongamento, o segmento extensível torna-se mais longo pelo recrutamento da titina inextensível, quando sua ancoragem aos filamentos grossos começa a deslizar ou quando as extremidades distais dos filamentos grossos tornam-se distorcidas.

Confirmando os achados de Wang et al. (1991), Pollack (1990) citado por Alter (1999), observou que no início do alongamento o músculo é mais extensível pois a titina não é estendida. Com o aumento da amplitude de

alongamento ocorre a cristalização da tropomiosina, o que a torna rigidamente inextensível, mantendo o sarcômero dentro de sua amplitude de comprimento de trabalho. Se o aumento na amplitude persistir, a tropomiosina rompe-se e a titina torna-se responsável pela manutenção da integridade do sarcômero até que seja feito o reparo da tropomiosina. Desta forma, é possível concluir que a titina é responsável também por causar aumento da resistência que influencia a extensibilidade passiva.

Já a desmina, que é o principal filamento intermediário do músculo esquelético e provê um suporte ao citoesqueleto sarcomérico (Lieber, 2002), é responsável pela união das linhas Z tanto de forma radial como longitudinal, além de realizar ligações entre a miofibrila e outras estruturas, como a mitocôndria, núcleo, sarcolema e costâmeros (Shah et al., 2004).

Desta forma, quando ocorre alteração no comprimento do sarcômero, a desmina contribui para o aumento da resistência passiva ao alongamento devido a sua ligação radial e longitudinal (Gajdosik, 2001)

Devido a importância da desmina para a estrutura miofibrilar, Shah et al. (2001) estudaram a influência desta na adaptação do músculo sóleo imobilizado por quatro semanas, e observaram que houve redução de 26% no número de sarcômeros em série nos músculos normais e 12% nos músculos *knockout* (sem desmina). Observaram também redução de 25% na área de secção transversa dos músculos normais e 44% nos *knockout*. Entretanto, os autores concluíram que a desmina não é essencial na resposta muscular à

imobilização, mas especulam que a mesma possui importância na regulação da organização dos sarcômeros.

Em outro estudo, Shah et al. (2002) observaram a resposta do músculo extensor digital longo ao alongamento em animais normais e *knockout*. Os animais knockout apresentaram aumento no desalinhamento dos discos Z e no comprimento do sarcômero, sugerindo que a desmina possui papel importante na organização lateral miofibrilar durante carga mecânica, influenciando na resistência passiva ao alongamento.

Já o tecido conjuntivo, que envolve miofibras, feixes e fascículos musculares, é constituído principalmente por fibras colágenas (Dutton, 2006) que apresenta apenas um leve grau de extensibilidade, podendo chegar a uma extensão de aproximadamente 3% (Ramachandran, 1967, citado por Alter 1999). Além disso, o endomísio e perimísio apresentam fibras em diferentes direções (Jarvinen et al., 2002), e no início do alongamento ocorre um ajuste destas fibras, aumentando a resistência ao alongamento adicional (Weiss e Greep, 1983). Desta forma, os três tipos de tecido conjuntivo contribuem para a resistência passiva, entretanto, o perimísio é considerado o maior responsável pela limitação da extensibilidade (Borg e Caulfield, 1980; Purslow, 1989).

Além dos fatores citados, a extensibilidade passiva encontra-se reduzida em situações de 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).

2.13 Viscoelasticidade

A elasticidade é a propriedade que faz com que um tecido retorne à sua forma ou tamanho original quando uma força é removida. É medida como a quantidade de força contrária dentro do próprio material. A verdadeira elasticidade é representada pelo modelo de Hooke que representa a natureza reversível de um material elástico no qual a deformação é proporcional somente à força aplicada (Taylor et al., 1990).

Existem materiais que não são perfeitamente elásticos e, ao ser aplicada uma força além do limite elástico, que é o menor valor de estresse para produzir tensão permanente no corpo, o material estressado não retornará ao seu estado original, levando a uma deformação tecidual permanente mesmo após a força ser removida. Contudo, quando o estresse aplicado é levemente além do limite elástico, ocorre uma deformação sem estresse adicional (Alter, 1999).

Um material possui também a propriedade de deformar-se permanentemente quando sobrecarregado além de sua amplitude elástica, sendo esta propriedade conhecida como plasticidade. Após o limite de sua amplitude elástica, ocorrem deformações consideráveis com pouco aumento de força, sem tendência para a recuperação (Alter, 1999).

A viscosidade é a propriedade dos materiais para resistir a cargas que produzem cisalhamento. O modelo de um pistão hidráulico, conforme proposto

por Newton, representa um material viscoso no qual a taxa e duração da aplicação de força sobre ele influenciam nas mudanças de seu comprimento (Taylor et al., 1990). Reduzindo a viscosidade de um tecido é possível obter uma extensibilidade aumentada (Alter, 1999).

Entretanto, muitos materiais não são perfeitamente elásticos ou plásticos e apresentam uma combinação de elasticidade e viscosidade, ou seja, viscoelasticidade. Se um material viscoelástico é alongado e mantido em um comprimento constante, o estresse interno do material, ou força existente nesse comprimento, diminui gradualmente, sendo este decline chamado de relaxamento de estresse viscoelástico (Taylor et al., 1990).

Quando o material viscoelástico é submetido a baixas cargas, o mesmo apresenta comportamento elástico, pois mantém algum grau de tensão. Com cargas mais altas a resposta apresenta-se de forma plástica; já com cargas aplicadas durante um período de tempo, o tecido exibe uma deformação viscosa, ou seja, a tensão diminui com o tempo (Alter, 1999; Taylor et al., 1990).

Segundo Frost (1967), citado por Alter (1999), a curva de estresse-tensão de um material elástico é idêntica durante as fases de carregamento e descarregamento. Já um material viscoelástico apresenta um fenômeno chamado histerese que é associado à perda de energia durante os ciclos de carga e descarga. Ou seja, uma maior energia é absorvida durante a fase de carregamento do que é dissipada na descarga.

Garde (1988), citado por Alter (1999), afirma que a histerese é o efeito desejado daqueles procedimentos que produzem deformação benéfica para

uma posição mais eficiente.

Segundo Sapega, Quedenfeld e Moyer (1981), os fatores influentes na proporção de alongamento plástico e elástico são a quantidade de força aplicada, duração da força e a temperatura do tecido. Assim, para um alongamento elástico são necessários alta força, curto tempo e baixa temperatura, e para um alongamento plástico baixa força, longo tempo e alta temperatura.

Como muitos tecidos biológicos, o músculo age como um material viscoelástico. Portanto, se um músculo for alongado em comprimento mantido constante, a força necessária para manter esse alongamento diminui ao longo do tempo, pois a tensão passiva do músculo diminui (estresse de relaxamento) e o seu comprimento é aumentado. Entretanto, quando a força é removida, o músculo retorna vagarosamente ao comprimento original. Magnusson, Aagard e Nielson (2000) mostraram que o alongamento estático de 45 segundos promoveu relaxamento do estresse viscoelástico instantâneo de 18 a 20%, porém o comprimento muscular original retornou ao valor prévio ao alongamento em menos de 1h.

Kisner e Colby (1992) afirmam que os ganhos com alongamento de curta duração são transitórios e atribuídos a uma folga temporária entre a actina e miosina. Já alongamentos com mais de 20 minutos de duração trariam ganhos mais duradouros, pois um material exposto a alongamento deforma de acordo com suas propriedades viscoelásticas, e quando uma força relativamente baixa é sustentada por um longo período, a maioria dos materiais deforma de maneira

tempo-dependente. Segundo Woo e Young (1991), citado por Rosário, Marques e Maluf (2004), se a força é interrompida, o material retorna ao seu comprimento original também de forma tempo-dependente.

Imediatamente após o alongamento ocorre aumento da amplitude de movimento por meio de um decréscimo na viscoelasticidade e aumento na tolerância ao alongamento. Em longo prazo esse aumento na amplitude ocorre não só pela viscoelasticidade, mas também devido à adição de sarcômeros em série (Shrier e Gossal, 2000).

O tecido conjuntivo também apresenta comportamento viscoelástico, e a temperatura possui influência significativa no comportamento mecânico do tecido sob estresse de tração. Com o aumento da temperatura, ocorre diminuição da rigidez e aumento da extensibilidade (Laban, 1962, citado por Alter, 1999). Em altas temperaturas (40 °C) ocorre uma transição térmica na microestrutura do colágeno que aumenta significativamente o relaxamento do estresse viscoso do tecido colagenoso, permitindo maior deformação plástica quando o mesmo é estendido (Rigby et al., 1959, citado por Alter, 1999; Mason e Rigby, 1963, citado por Alter, 1999). Acredita-se que nessa transição térmica a junção intermolecular torna-se parcialmente desestabilizada, aumentando as propriedades viscoelásticas do tecido colagenoso (Rigby, 1964, citado por Alter, 1999).

2.14 Resposta Muscular ao Calor e Frio

Vários pesquisadores têm utilizado a associação de alongamento com calor ou frio para os estudos desses recursos nas respostas musculares (Chambers, 1969; Sapega, Quedenfeld e Moyer, 1981; Minton, 1993; Brodowicz, Welsh e Wallis, 1996; Burke et al., 2001; Brucker et al., 2005; Usuba et al., 2006, Brasileiro, Faria e Queiroz, 2007).

O calor é responsável pelo aumento da extensibilidade do colágeno, aumento do fluxo sanguíneo, diminuição da percepção de dor, dos espasmos musculares e da viscosidade do tecido, resultando no aumento da amplitude de movimento (Lentell et al., 1992; Prentice, 2002) sendo, portanto, muito utilizado na prática clínica.

Peres e colaboradores (2002) realizaram mensuração da amplitude de movimento em três grupos experimentais: alongado; alongado associado à diatermia de ondas curtas; e alongado, diatermia e aplicação de gelo. A diatermia aplicada previamente ao alongamento mostrou-se mais efetiva no aumento da amplitude de movimento quando comparado com o grupo apenas alongado. Entretanto, no grupo em que fora aplicado gelo nos 5 minutos restantes do tempo do alongamento não ocorreu benefícios com relação ao aumento da amplitude de movimento.

Draper e colaboradores (2002) compararam o efeito do alongamento associado simultaneamente à diatermia com grupo apenas submetido ao alongamento sobre a flexibilidade do músculo isquiotibial. Esse estudo não

mostrou diferença significativa entre os grupos, alegando ser necessário mais estudos com relação ao tempo de aplicação dos métodos.

Em 2005, Brucker e colaboradores observaram o tempo de manutenção do ganho na flexibilidade do tornozelo de estudantes e os efeitos da associação simultânea da diatermia nessa manutenção. Após um período de alongamento de 18 dias, eles observaram que o ganho de flexibilidade permanece pelo menos três semanas após o tratamento, contudo, a diatermia não influenciou nessa retenção.

Em experimento animal com ratos, Usuba e colaboradores (2006) compararam duas modalidades de calor aplicadas após o desenvolvimento de contratura de joelho resultante de imobilização. A aplicação do alongamento iniciou-se no 42º dia após a imobilização, sendo realizada três vezes por semana durante duas semanas. Os animais tiveram a pata posterior alongada durante 20 minutos com aplicação simultânea dos recursos terapêuticos utilizados (terapia infravermelha e ultra-som). A utilização dos recursos mostrou aumento significativo na amplitude de movimento comparado com o grupo apenas alongado, não sendo, entretanto, encontrado diferenças entre as modalidades terapêuticas.

As divergências encontradas nos estudos podem ser devido às diferenças nos protocolos de alongamento, tipo de recurso termoterapêutico aplicado, temperatura alcançada, condição da articulação e do músculo alongado.

A crioterapia tem a propriedade de aumentar o alongamento muscular

devido à diminuição da percepção de dor e do espasmo muscular (Chambers, 1969; Olson e Stravino, 1972).

Cornelius, Ebrahim e Watson (1992) estudaram os efeitos da aplicação de gelo e técnicas de Facilitação Neuromuscular Proprioceptiva na flexibilidade da articulação do quadril em homens. Os resultados de amplitude de movimento mensurada logo após a intervenção mostraram que não houve diferenças entre o grupo apenas alongado e o grupo alongado com gelo, indicando que a aplicação de gelo não influenciou na efetividade da técnica de alongamento aplicada.

Em experimento com humanos, Minton (1993) aplicou crioterapia ou aquecimento previamente ao alongamento e observou as variações na amplitude de movimento mensurada logo após a realização do alongamento. Foi possível observar que tanto a associação de aquecimento com alongamento quanto crioterapia com alongamento obtiveram resultados significativos quando comparados com o alongamento sem nenhum recurso, contudo, nenhuma diferença foi observada entre os dois recursos utilizados.

Brodowicz, Welsh e Wallis (1996) investigaram a eficácia da aplicação de gelo e calor associados simultaneamente ao alongamento no aumento da flexibilidade do músculo isquiotibial. Os sujeitos que utilizaram o gelo como recurso obtiveram média de amplitude significativamente maior que os indivíduos apenas alongados ou que tiveram a associação do calor, sendo a mensuração da amplitude realizada imediatamente após a aplicação dos recursos.

Utilizando-se da aplicação de alongamento no músculo isquiotibial precedido da utilização de calor e gelo, Taylor, Waring e Brashear (1995) observaram que o grupo em que fora aplicado calor demonstrou aumento significativo na flexibilidade quando comparado com grupo gelo e o grupo apenas alongado.

Burke et al. (2001) compararam as mudanças no comprimento muscular do isquiotibial, resultante de treino de flexibilidade utilizando o método de Facilitação Neuromuscular Proprioceptiva associado à imersão previa em água fria ou em água quente. Todos os grupos mostraram aumento no comprimento muscular, entretanto não houve diferenças entre os grupos analisados.

Brasileiro, Faria e Queiroz (2007) avaliaram os efeitos do resfriamento e do aquecimento sobre a flexibilidade dos músculos isquiotibiais. A técnica utilizada para alongamento foi a “contração-relaxamento” e o resfriamento e aquecimento do músculo foram realizados durante os 25 minutos que precediam o alongamento. A intervenção foi realizada por duas semanas totalizando 10 sessões. Os resultados mostraram que os efeitos agudos do alongamento (segundos a minutos após a sessão) foram maiores no grupo submetido ao resfriamento. Entretanto, não houve influência do aquecimento ou do resfriamento nos efeitos crônicos do alongamento (mais de um dia), sugerindo que as alterações musculares crônicas dependem exclusivamente da eficiência da técnica de alongamento.

A associação de frio e calor é tema de vários estudos, entretanto

estes avaliam os resultados por meio de medida subjetiva, como a goniometria, não sendo encontrados na literatura os efeitos do calor e frio, associado ao alongamento, na morfologia do músculo esquelético. Além disso, esses estudos não relatam se o grau de encurtamento muscular era similar entre os indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos. Este fator é importante uma vez que os efeitos do alongamento podem estar relacionados a determinado grau prévio de encurtamento muscular. A não padronização do encurtamento do músculo submetido ao tratamento pode influenciar nos resultados obtidos.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi analisar e comparar o efeito da técnica de alongamento associada simultaneamente a recursos térmicos, frio e termoterapia, em músculo sóleo de rato previamente submetido a encurtamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados 37 ratos machos *Wistar* (264 ± 15 g) mantidos em grupos sob condições controladas de biotério, ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ($23\pm 2^\circ\text{C}$) e livre acesso à água e ração. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (029/2006).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais:

- a) Controle (C; n=7)
- b) Imobilizado (I; n=8)
- c) imobilizado + alongamento (A; n=8)
- d) imobilizado + gelo + alongamento (G;n=7)
- e) imobilizado + infra-vermelho + alongamento (IV; n=7).

Para os procedimentos de imobilização, alongamento e retirada dos músculos os animais foram anestesiados com Ketalar® (50mg/mL) e Rompun® (2g/100mL), na proporção de 1:1, na dose de 0,1mL/100g de massa corporal, via intramuscular. Após o procedimento experimental os animais foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical.

No início do experimento o grupo IV consistia de 7 animais, contudo 2 animais morreram devido à sobredose de anestesia.

4.2 Imobilização

Para o procedimento de imobilização foi utilizado modelo proposto por Coutinho et al. (2002), que limita a carga e movimentação do membro imobilizado, mantendo o membro contralateral livre para deambulação.

Os animais previamente anestesiados tiveram o tornozelo esquerdo imobilizado em torno de 176° de flexão plantar (máxima), garantindo assim a manutenção da posição de encurtamento do músculo sóleo (Figura 1). A imobilização foi mantida por um período de 21 dias.



Figura 1 – Animal com pata posterior esquerda imobilizada em flexão plantar máxima por meio de órtese.

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.

4.3 Procedimento de Alongamento

Os animais foram submetidos ao procedimento de alongamento passivo, que foi realizado diariamente a partir do 15º dia de imobilização, somando um total de sete sessões de alongamento. Para o procedimento de alongamento os animais anestesiados tiveram o dispositivo de imobilização retirado e a pata posterior esquerda foi mantida em dorsiflexão máxima do tornozelo durante 40 minutos.

O alongamento foi mantido manualmente pelo pesquisador (Figura 2), sendo o dispositivo de imobilização recolocado ao final de cada sessão de alongamento.

Sabemos que o músculo esquelético responde ao alongamento com um relaxamento do estresse viscoelástico, desta forma, o alongamento foi aplicado manualmente até a resistência do tecido e conforme ocorria o relaxamento do estresse, a amplitude de movimento do alongamento era aumentada até o limite máximo.



Figura 2 – Alongamento passivo do músculo sóleo realizado manualmente, durante 40 minutos pelo período de sete dias consecutivos.

4.4 Alongamento Associado à Aplicação de Frio e Calor

Para a realização do alongamento associado à aplicação de calor e frio, os animais anestesiados foram tricotomizados na região do músculo sóleo, para melhor aquecimento e resfriamento, respectivamente, da pele do animal.

Para determinação do protocolo de resfriamento, foi realizado estudo piloto (n=4) para mensurar a temperatura no músculo sóleo durante a aplicação de gelo. Os animais foram anestesiados e, com uma pequena incisão na parte lateral do membro posterior, um eletrodo que mensura a temperatura foi colocado sob o músculo sóleo. Inicialmente, sem aplicação de recurso, o músculo sóleo apresentava temperatura de 29°C. Após 5 minutos de aplicação de gelo moído (40g), acondicionado em saco plástico, sobre a parte posterior da

pata posterior do animal, a temperatura chegou aos 10°C, mantendo-se próximo deste valor durante os quarenta minutos de aplicação. Assim, foi possível assegurar a eficiência do protocolo de resfriamento na diminuição da temperatura do músculo sóleo durante a realização do alongamento.

Portanto, para a realização do alongamento, o resfriamento foi produzido da mesma forma que o estudo piloto, ou seja, com 40g de gelo moído acondicionado em saco plástico. O mesmo foi mantido manualmente durante todo o tempo de alongamento sobre a parte posterior do membro posterior esquerdo (Figura 3).



Figura 3 – Alongamento do músculo sóleo associado à aplicação de gelo moído, durante 40 minutos pelo período de sete dias consecutivos.

O calor foi obtido com terapia infra-vermelha com aparelho da CARCI[®] (150W e 60Hz), mantido a uma distância de 30 cm da pata posterior esquerda do animal (Usuba et al., 2006). Os animais foram protegidos do calor com a

utilização de caixa de isopor (Figura 4), para que a luz infra-vermelha tivesse a menor incidência possível sobre o corpo do animal, a fim de não causar aquecimento corporal.

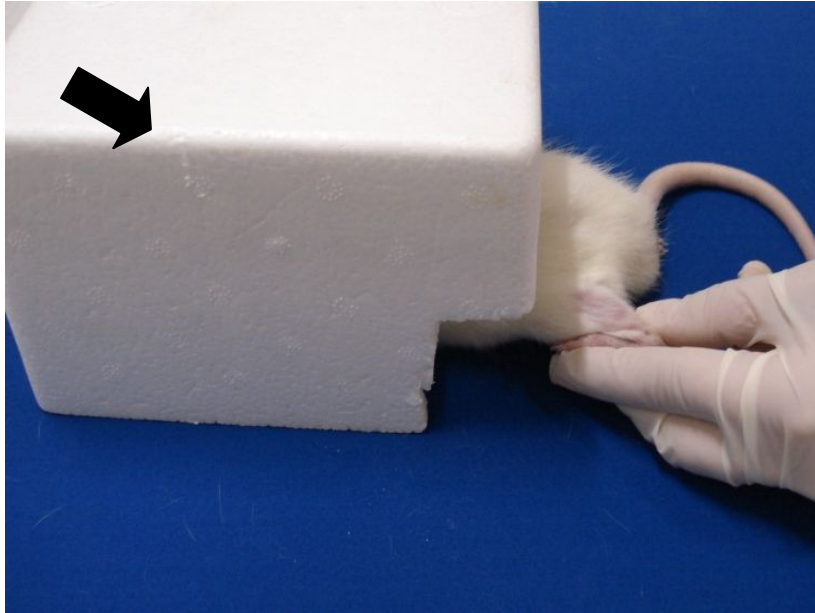


Figura 4 – Animal com proteção de isopor (seta) evitando aquecimento corporal no momento do alongamento associado ao infra-vermelho, realizado durante 40 minutos pelo período de sete dias consecutivos.

Ambos procedimentos, aplicação de frio e calor, foram realizados simultaneamente ao alongamento e mantidos durante todo tempo do mesmo (40 minutos).

4.5 Mensuração da Amplitude de Movimento

A mensuração da amplitude de movimento (ADM) foi realizada conforme proposto por Okita e colaboradores (2004), utilizando-se como

referência uma linha reta entre o quinto metatarso e o maléolo lateral da fíbula; e outra entre o maléolo lateral da fíbula e o centro da articulação do joelho. Para a mensuração da ADM utilizou-se um goniômetro CARCI® (Figura 5).



Figura 5 – Mensuração da amplitude de movimento do tornozelo do animal realizado com goniômetro.

A mensuração da ADM foi realizada levando em consideração o primeiro ponto de tensão ou resistência da articulação, ou seja, a mobilização passiva da dorsiflexão foi realizada pelo pesquisador até o primeiro ponto de resistência ao movimento, então a mensuração era feita.

Os animais dos grupos A, G e IV tiveram a ADM mensurada no primeiro dia do experimento e em todos os dias em que houve aplicação do alongamento, ou seja, do 15º ao último dia de experimento, sendo esta mensuração realizada previamente ao procedimento de alongamento.

Os animais dos grupos C e I tiveram a ADM obtida apenas no primeiro

e último dia do experimento.

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.

4.6 Preparação e Análise Muscular

No 22º dia após o início do experimento, todos os animais foram anestesiados, pesados, tiveram os músculos retirados e posteriormente eutanasiados.

O tornozelo foi mantido a 90º e o músculo sóleo, ainda fixado ao osso, teve seu comprimento obtido por meio de um paquímetro digital (MITUTOYO®) utilizando-se como referência a distância entre as junções miotendíneas. Após este procedimento o músculo sóleo foi retirado, pesado e dividido longitudinalmente em duas partes, uma para avaliação morfométrica e a outra para análise das adaptações de sarcômero.

Para análise morfométrica, realizada para determinar a área de secção transversa (AST) das fibras e densidade de tecido conjuntivo (TC), o ventre muscular foi preso com alfinetes em cortiça e posteriormente submetido ao congelamento em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. Foram obtidos cortes de 10µm de espessura em micrótomo criostato (Microm HM 505E, Zeiss, Alemanha) que foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Para análise da AST, foi selecionado um corte por músculo (Coutinho

et al., 2004) e deste, cinco campos foram captados por um sistema de imagens constituído de uma Câmera (Olympus[®], Mod C5050) acoplada ao microscópio óptico Olympus[®]. A mensuração da AST foi realizado por um microcomputador por meio do *software* Motic[®] Image Advanced 3.2 (Motic China Group[®]). Foram analisadas as áreas de secção transversa de 50 fibras por campo, totalizando 250 fibras por músculo (Figura 6).

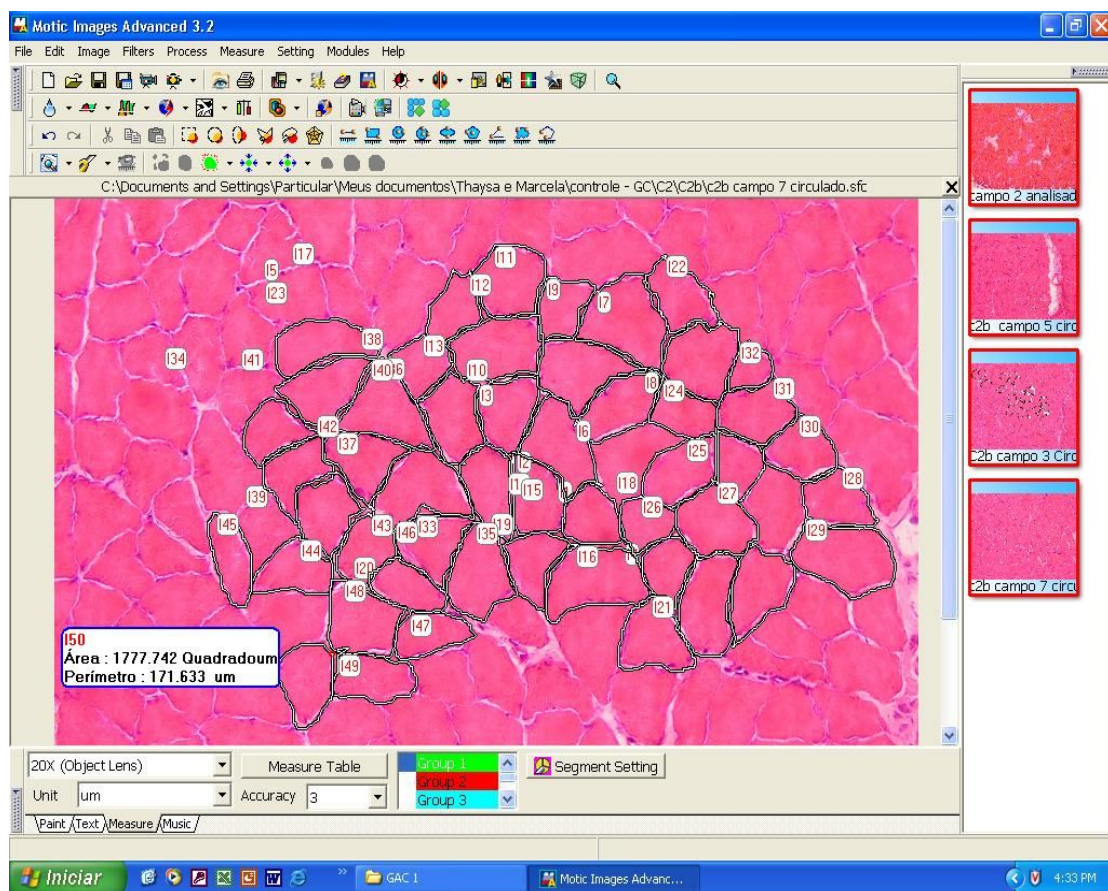


Figura 6 – Tela do *software* Motic[®] Image Advanced 3.2 mostrando análise da área de secção transversa das fibras musculares.

O método usado para mensuração da densidade de TC foi a planimetria por contagem de pontos (Mathieu et al., 1981), utilizando o *software*

Image Pro Plus®. O software aplicava uma “máscara” (Figura 7) com 551 intersecções sobre o campo e, desta forma, determinado o número de intersecções que eram coincidentes com o endomísio e perimísio, sendo desprezadas da contagem as regiões que continham vasos ou nervos. A mensuração foi realizada em um corte por músculo, em cinco campos por corte (Coutinho et al., 2004).

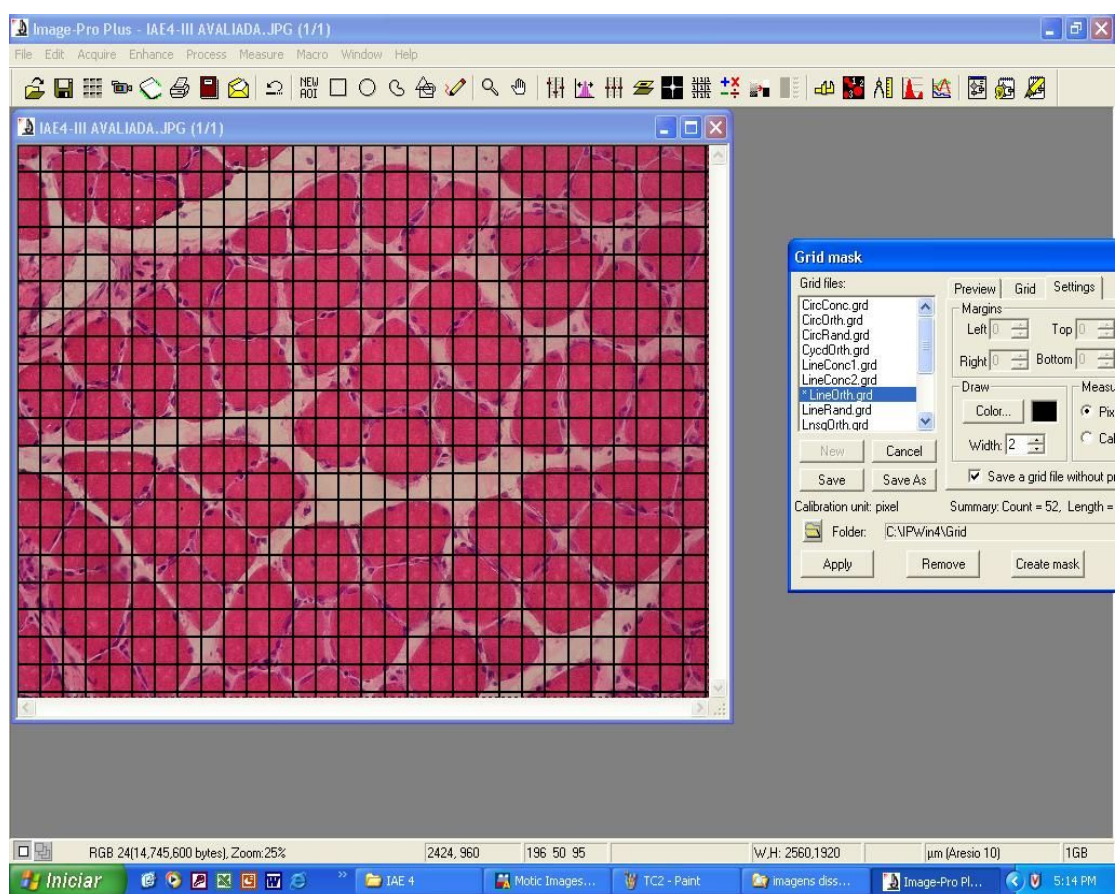


Figura 7 – Tela do software Image Pro Plus® mostrando a técnica de planimetria por contagem de pontos utilizada para mensuração da densidade de área de tecido conjuntivo.

Alguns músculos apresentaram artefato de congelamento muscular, o

que impossibilitou a análise de AST e densidade do TC, sendo analisados apenas seis animais nos grupos C, I e A.

Para análise das adaptações de sarcômero o músculo foi preso em cortiça, na extensão muscular previamente determinada quando o mesmo ainda estava fixado ao osso. Posteriormente, foi fixado em glutaraldeído a 2,5% por 3h, removido da cortiça e colocado em ácido nítrico a 30% por dois dias, permanecendo em glicerol a 50% até o momento da análise (Williams e Goldspink, 1971).

Para determinar o número de sarcômeros, foram retiradas cinco fibras/músculo, fotografados seis campos/fibra e de cada campo foi contado o número de sarcômeros ao longo de 50 μ m, somando uma distância de 300 μ m/fibra (Figura 8). Para isso, foi utilizado o *software* Motic[®] Image Advanced 3.2, câmera digital (Olympus[®]) acoplada a microscópio (Olympus[®]) integrado a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com objetiva de 100x.

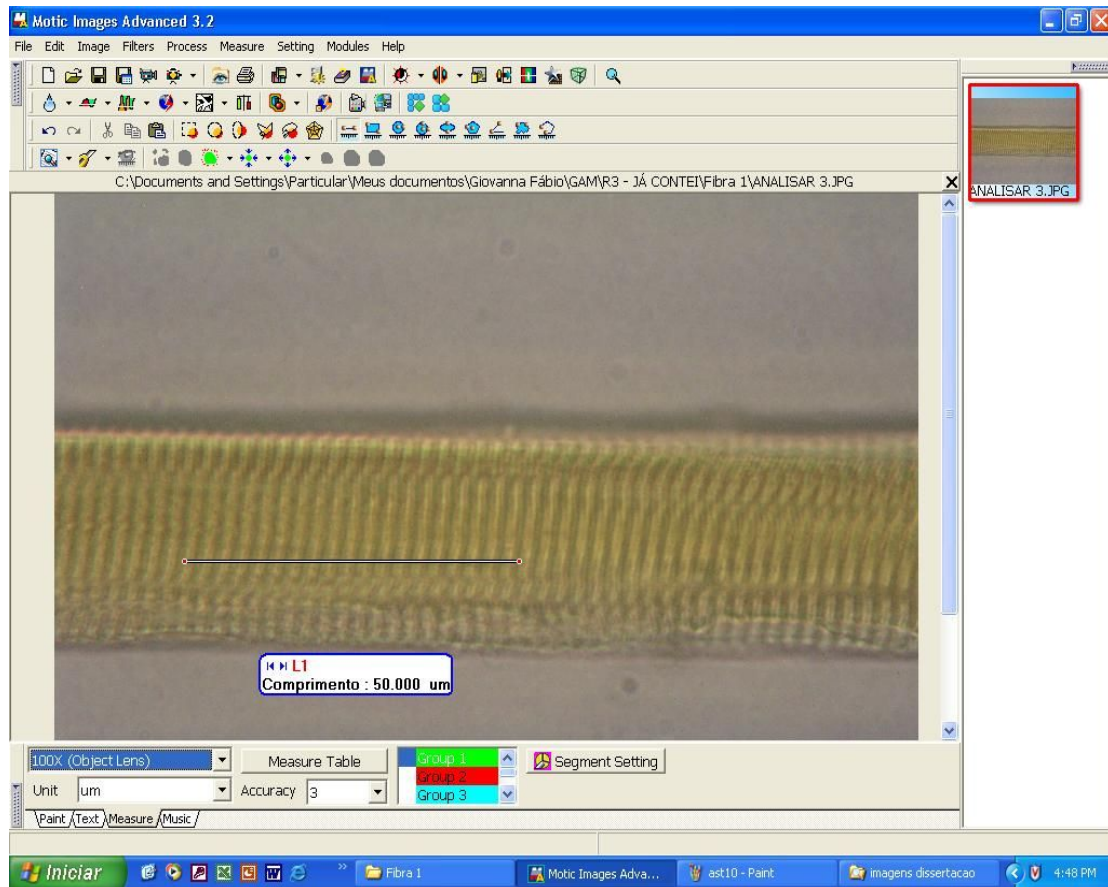


Figura 8 – Tela do *software* MotiC[®] Image Advanced 3.2 mostrando o sistema utilizado para contagem do número de sarcômeros em uma extensão de 50 μm .

O número total de sarcômeros em cada fibra muscular foi determinado pela correlação entre o número de sarcômeros identificados em uma distância de 300 μm e o comprimento total do músculo, e a extensão média de cada sarcômero foi obtida pela divisão do comprimento muscular pelo número de sarcômeros (Williams et al., 1988).

Devido a problemas no momento do processamento de alguns músculos, a análise de adaptações de sarcômero foi realizada em apenas sete animais do grupo A e seis animais dos grupos C e I.

4.7 Análise Estatística

Para análise dos dados foram utilizados recursos dos *softwares* SPSS® 11.0 e Bioestat® 4.0. Inicialmente foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade da amostra e o teste de Levene para avaliar a homocedasticidade. 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.

As variáveis massa muscular absoluta e relativa (dados não paramétricos) foram apresentadas em Box-Plot utilizando mediana e intervalo de confiança, enquanto que as outras variáveis (dados paramétricos) foram apresentadas em gráficos utilizando a média e desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Massa Corporal

Ao final do experimento foi observado que os animais do grupo C obtiveram ganho de massa corporal, enquanto que os animais dos grupos I, A, IV e G apresentaram perda do mesmo (C = 95 ± 9 g; I = -24 ± 6 g; A = -54 ± 13 g; IV = 50 ± 10 g; G = -45 ± 10 g). Essa alteração de massa foi significativa quando comparados os animais dos grupos C com os demais grupos experimentais ($p \leq 0,02$; Figura 9).

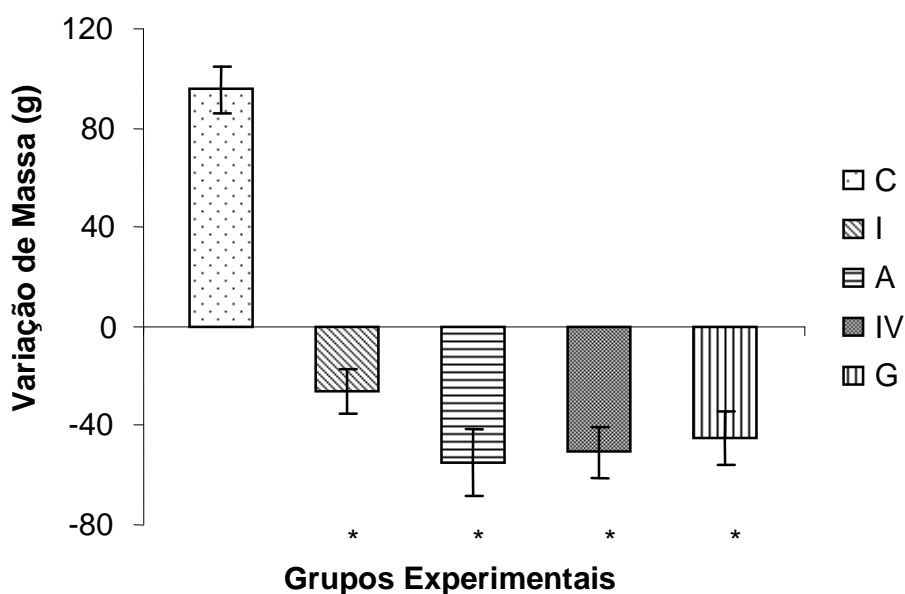


Figura 9 – Variação de massa corporal inicial e final dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com C; $p \leq 0,02$

5.2 Massa Muscular

Comparando a massa muscular absoluta entre os grupos experimentais foi observado que, com exceção do grupo A, todos os outros grupos apresentaram massa muscular significativamente menor quando comparado ao grupo C ($C = 0,21 \pm 0,03$ g; $I = 0,09 \pm 0,01$ g; $A = 0,10 \pm 0,02$ g; $IV = 0,07 \pm 0,03$ g; $G = 0,09 \pm 0,00$ g; $p < 0,05$; Figura 10).

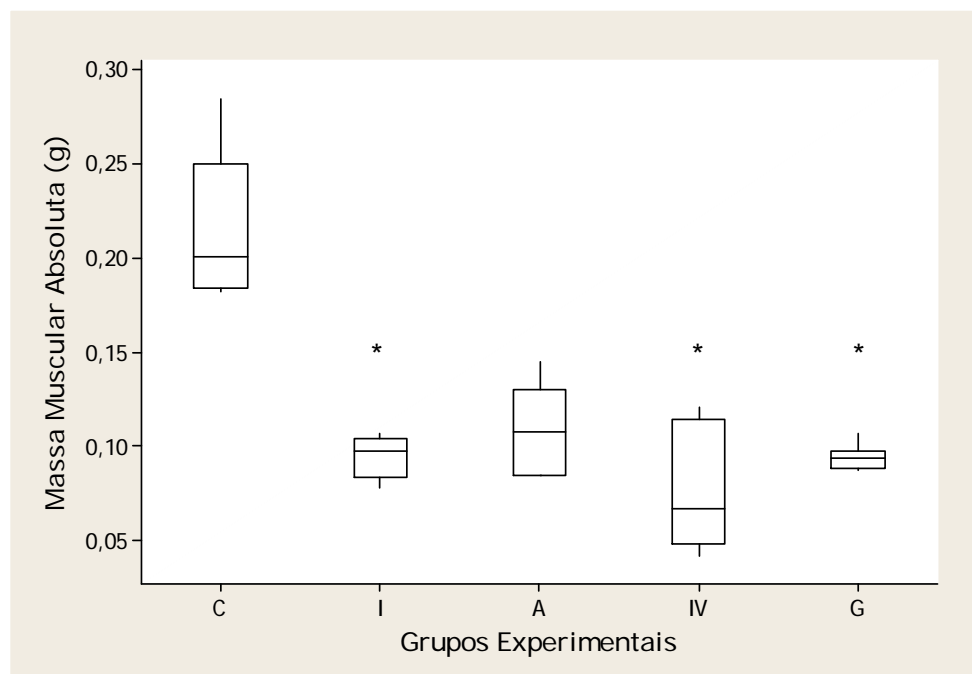


Figura 10 – Massa muscular absoluta dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com C; $p < 0,05$

Com relação a massa muscular relativa foi observado que somente os grupos I e IV apresentaram diminuição da massa quando comparados ao grupo C (C = $0,06 \pm 0,00$ %; I = $0,03 \pm 0,00$ %; A = $0,04 \pm 0,01$ %; IV = $0,03 \pm 0,01$ %; G = $0,04 \pm 0,00$ %; $p < 0,05$; Figura 11).

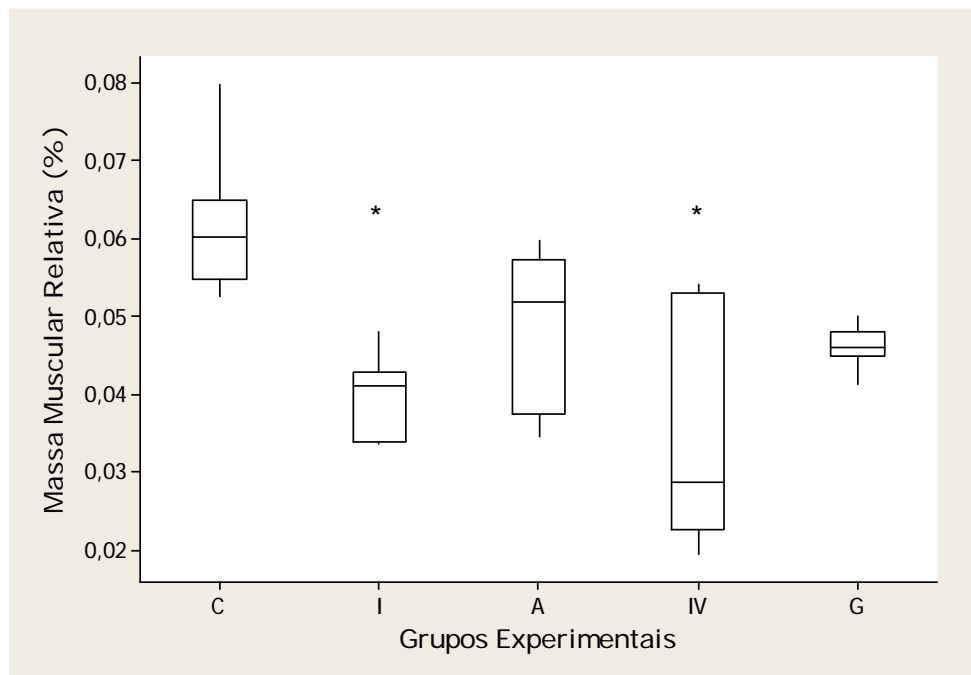


Figura 11 – Massa muscular relativa dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com C; $p < 0,05$

5.3 Amplitude de Movimento Inicial e Final

Todos os grupos apresentaram valores iniciais de amplitude de movimento similar entre eles, não havendo, portanto, diferença significativa entre os grupos experimentais, como observado na figura 12.

Com relação a ADM no final do experimento foi observado que os grupos I, A, IV e G apresentaram menores valores em relação ao grupo C (C = $157 \pm 5^\circ$; I = $82 \pm 21^\circ$; A = $99 \pm 4^\circ$; IV = $89 \pm 2^\circ$; e G = $77 \pm 3^\circ$; $p \leq 0.0001$; Figura 12).

O grupo A apresentou ADM maior quando comparado aos grupos IV e G ($p \leq 0,004$), além disso, o grupo IV mostrou valor de ADM maior que o grupo G ($p = 0,0008$; Figura 12).

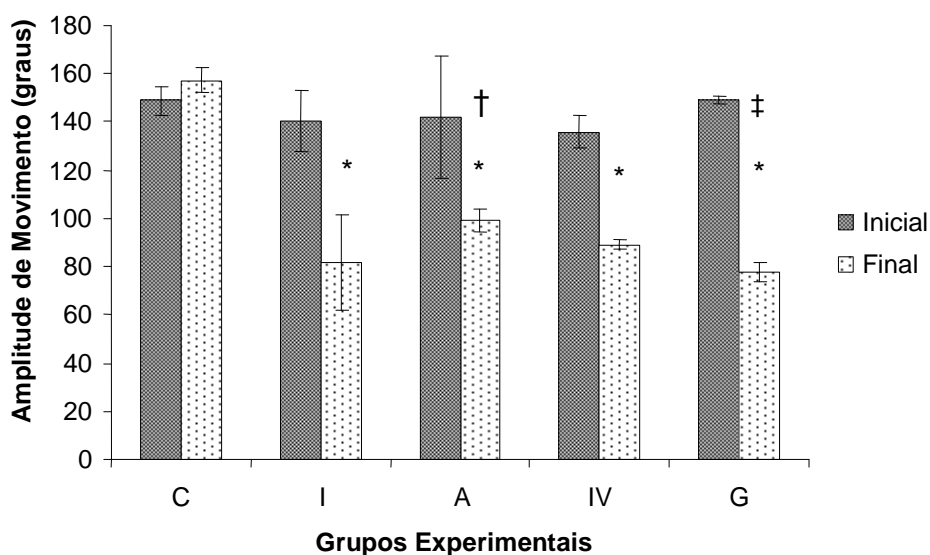


Figura 12 – Amplitude de movimento inicial e final dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com C; $p \leq 0,0001$

† diferente quando comparado com IV e G; $p \leq 0,04$

‡ diferente quando comparado com IV; $p=0,0008$

5.4 Variação da Amplitude de Movimento

A figura 13 mostra o comportamento da ADM dos grupos durante todo o experimento.

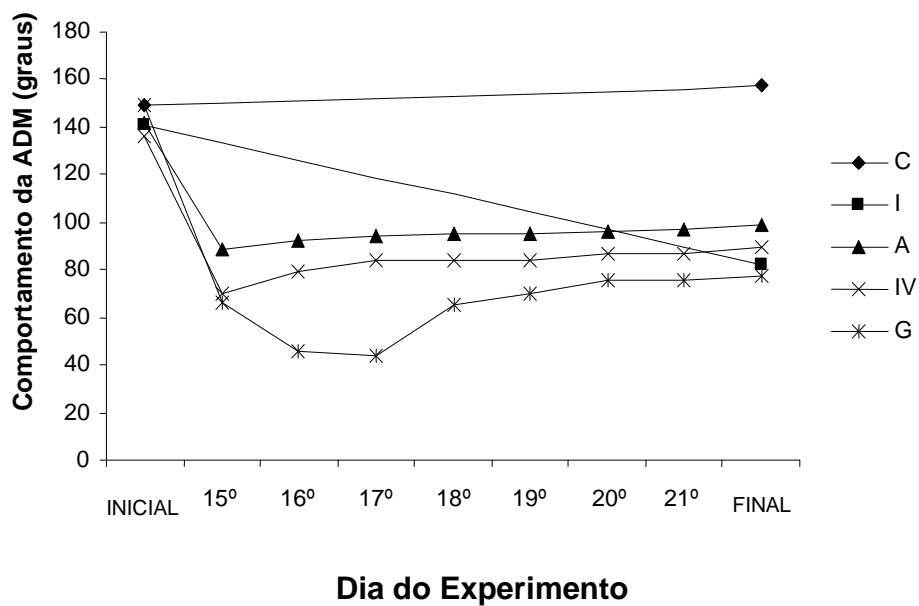


Figura 13 – Variação da Amplitude de movimento dos grupos experimentais durante os dias de aplicação de alongamento.

5.5 Comprimento Muscular

Foi observado que os animais do grupo I apresentaram comprimento muscular significativamente menor que os animais dos grupos C, G e IV, sem diferenças entre os outros grupos experimentais (C = 21 ± 1 mm; I = 19 ± 1 mm; A = 20 ± 1 mm; IV = $21 \pm 0,6$ mm; G = $21 \pm 0,5$ mm; $p \leq 0,05$; Figura 14).

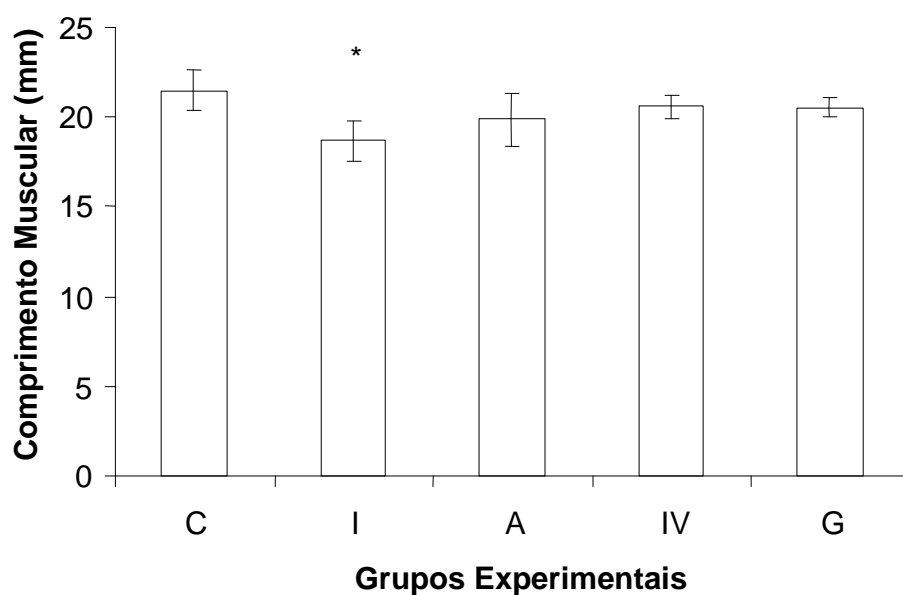


Figura 14 – Comprimento muscular dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com C, IV e G; $p \leq 0,05$

5.6 Número de Sarcômeros em Série

Conforme Figura 15, foi observado que no grupo I o músculo sóleo apresentou menor número de sarcômeros em série que todos os outros grupos experimentais (C = 7551 ± 394 ; I = 5635 ± 615 ; A = 6843 ± 556 ; IV = 6929 ± 283 ; G = 7431 ± 292 , $p \leq 0,0006$).

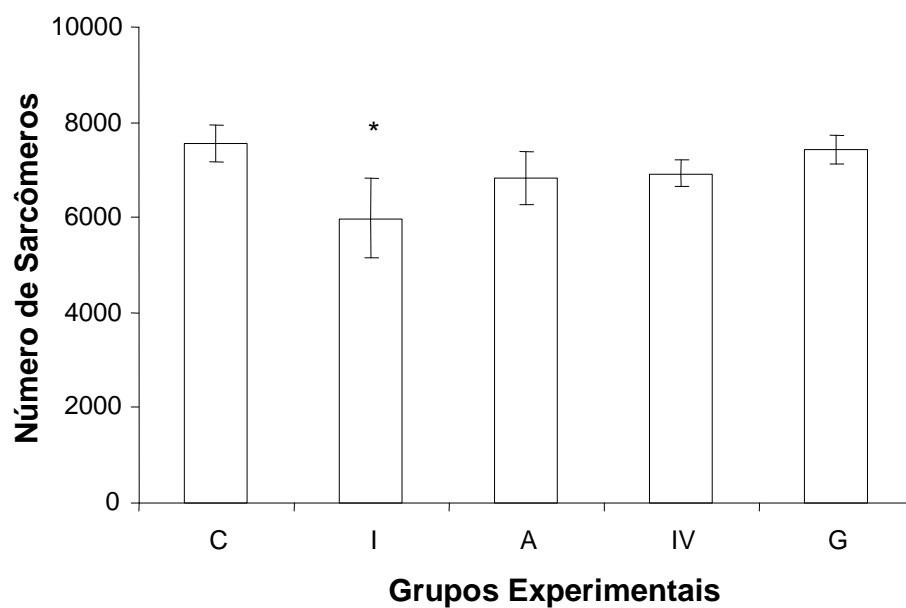


Figura 15 – Número de sarcômeros em série dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com todos os grupos; $p \leq 0,0006$

5.7 Extensão do Sarcômero

Foi observado que os animais dos grupos I, IV e G apresentaram maior extensão do sarcômero no músculo sóleo quando comparados aos grupos C e A ($C = 2,81 \pm 0,2 \mu\text{m}$; $I = 3,16 \pm 0,3 \mu\text{m}$; $A = 2,90 \pm 0,1 \mu\text{m}$; $IV = 3,37 \pm 0,2 \mu\text{m}$; $G = 3,61 \pm 0,1 \mu\text{m}$; $p \leq 0,004$; Figura 16).

Conforme figura 16 é possível observar também que o grupo C apresentou valor similar ao grupo A, não havendo diferença significativa entre os mesmos.

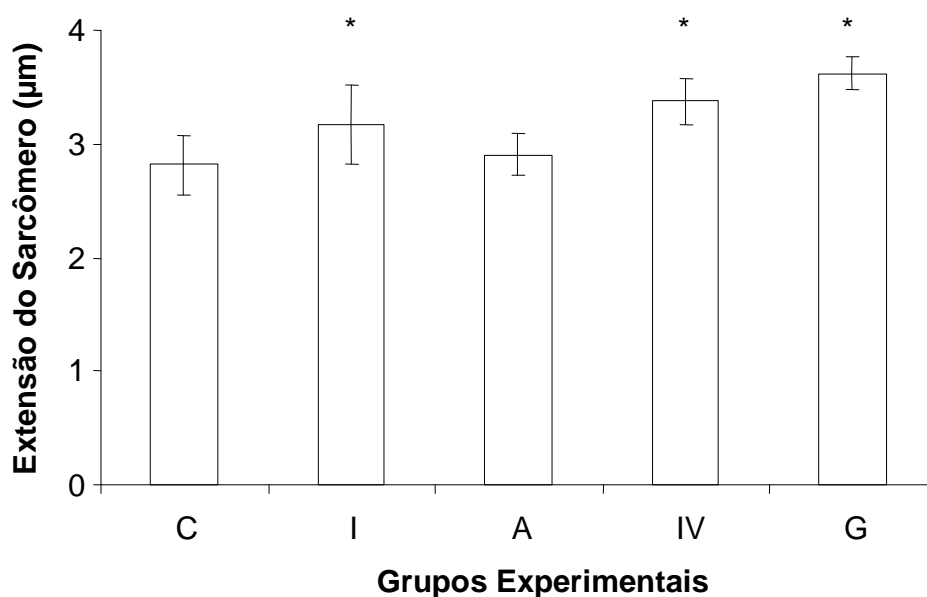


Figura 16 – Extensão do sarcômero dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com C e A; $p \leq 0,004$

5.8 Área de Secção Transversa

Com exceção do grupo A, a AST do músculo sóleo de todos os outros grupos apresentaram valores menores que o grupo C (C = $2092 \pm 290 \mu\text{m}^2$; I = $831 \pm 129 \mu\text{m}^2$; A = $2438 \pm 475 \mu\text{m}^2$; IV = $1295 \pm 258 \mu\text{m}^2$; G = $1426 \pm 162 \mu\text{m}^2$; $p \leq 0,002$, Figura 17).

Além disso, o grupo A apresentou valor de AST maior do que os grupos I, IV e G ($p \leq 0,00001$; Figura 17).

Os resultados também mostram que o grupo G apresentou AST maior que o grupo I ($p = 0,008$), como observado na figura 17.

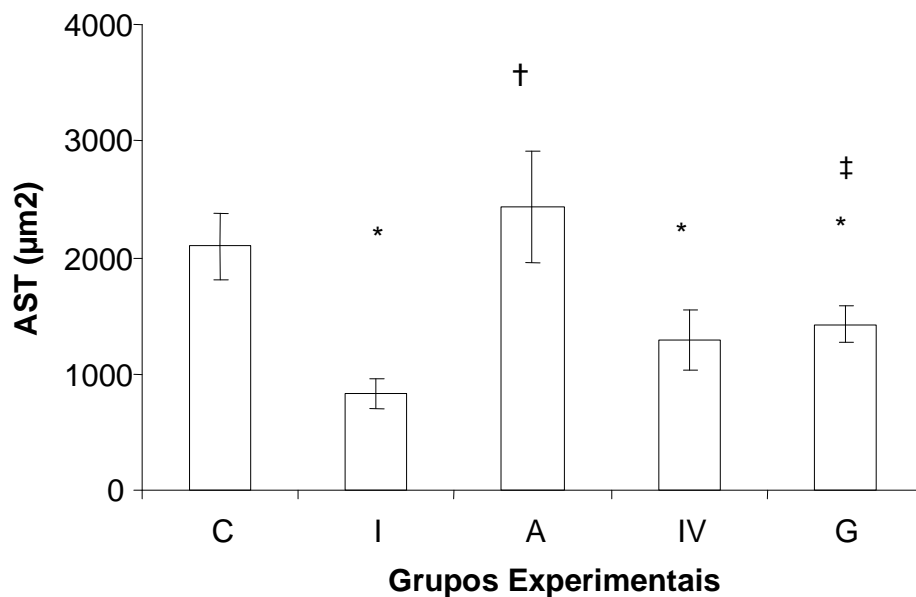


Figura 17 – Área de secção transversa dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com C; $p \leq 0,002$

† diferente quando comparado com I, IV e G; $p \leq 0,00001$

‡ diferente quando comparado com I; $p = 0,008$

5.9 Densidade de Tecido Conjuntivo

Observou-se que todos os grupos experimentais apresentaram músculo sóleo com maior densidade de TC quando comparados ao grupo C (C = $17 \pm 1\%$, I = $33 \pm 3\%$; A = $33 \pm 1\%$; IV = $29 \pm 2\%$; G = $23 \pm 3\%$; $p \leq 0,003$; Figura 18).

Além disso, observa-se que o grupo G apresentou menor densidade de TC que os grupos I, A e IV ($p \leq 0,003$; Figura 18).

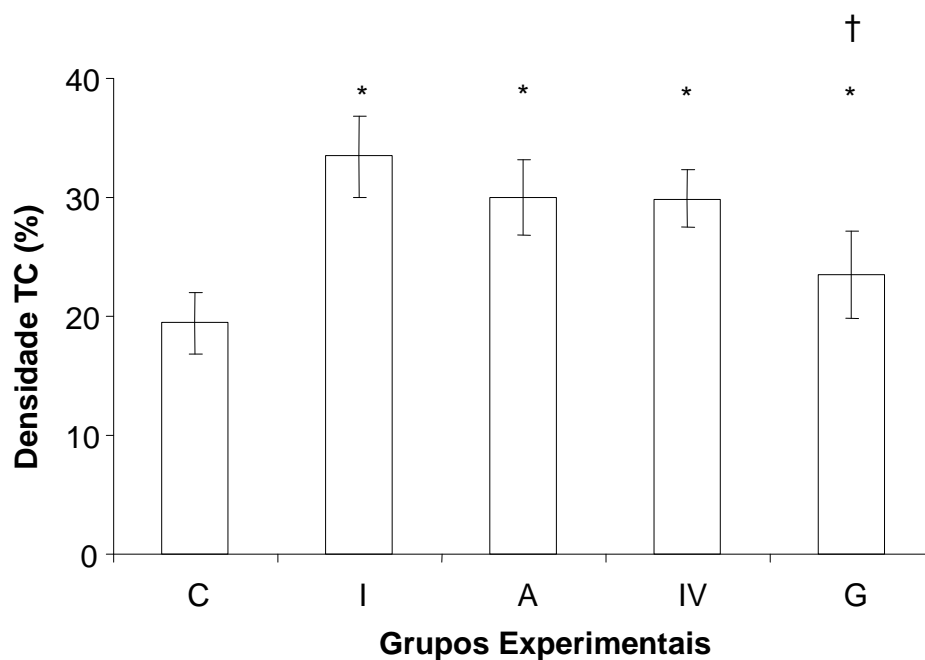


Figura 18 – Densidade de tecido conjuntivo dos grupos experimentais

* diferente quando comparado com C; $p \leq 0,003$

† diferente quando comparado com I, A e IV; $p \leq 0,003$

6 Discussão

6.1 Protocolo experimental

A utilização do músculo sóleo no presente experimento ocorreu devido a sua estrutura relativamente simples, com fibras que correm de tendão a tendão, apresentando dessa forma os diferentes tipos de fibra no seu ventre muscular, o que garante que a mensuração da área de secção transversa não tenha sido específica para um determinado tipo de fibra muscular (Williams e Goldspink, 1971).

O músculo sóleo é classificado como uniarticular, o que previne problemas biomecânicos da aplicação do alongamento. Além disso, apresenta menor variação do número de sarcômeros entre as fibras do mesmo músculo ou 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 (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 com oito semanas de vida a adição do número de sarcômeros do sóleo de ratos já está completa, mostrando que o processo de desenvolvimento muscular já terminou (Williams e Goldspink, 1978). Além disso, sabe-se que animais jovens podem apresentar adaptações de tendão quando submetidos a

protocolos de alongamento (Tardieu et al., 1977; Alnaqeeb, Zaid e Goldspink, 1984).

A utilização de um grupo controle deve-se ao fato de estudos prévios mostrarem sinais de lesão e regeneração nos músculos contralaterais, devido ao uso excessivo e compensatório, não sendo considerado o membro contralateral como um controle apropriado (Yang et al., 1997; Coutinho et al., 2004).

Estudo prévio mostrou que o modelo de imobilização utilizado neste estudo não causou edema ou úlceras cutâneas nos animais, como observado em estudo de Coutinho e colaboradores (2002). O modelo de órtese possui fácil manuseio, permite o ajuste ao animal sempre que necessário, além do baixo custo para confecção.

Com relação ao tempo de imobilização utilizado, estudos mostraram que a imobilização em posição de encurtamento por apenas 48h foi 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, baseado em resultados de trabalhos recentes, o presente estudo utilizou três semanas de imobilização (Coutinho et al., 2004; Gomes et al., 2004).

Diferente da maioria dos estudos prévios realizados com alongamento, onde as sessões de alongamento tiveram início logo após, algumas horas, ou poucos dias depois da imobilização (Williams, 1988; Williams et al., 1988; Williams, 1990; Coutinho et al., 2004; Mattiello-Sverzut et al., 2006;

Gomes et al., 2007), no presente estudo o protocolo de alongamento foi iniciado após duas semanas de imobilização. Isto porque o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do alongamento em músculos encurtados, enquanto nos outros estudos, o objetivo foi prevenir as conseqüências deletérias do encurtamento.

Uma limitação observada neste estudo é com relação a ausência do referencial da dor. Este referencial é importante, pois na prática clínica o mesmo é usado para indicar a amplitude máxima do alongamento a ser trabalhada, a fim de não causar estresse excessivo na unidade músculo-tendínea. No entanto, apesar da ausência do referencial algico, foi utilizada, como referência de alongamento máximo a ser aplicado, a resistência do tecido, com o objetivo de garantir um padrão de alongamento entre os animais.

A aplicação manual do alongamento, como utilizado neste estudo, apresenta vantagem comparada aos experimentos que utilizaram fita crepe para manutenção da amplitude de movimento (Coutinho et al., 2004; Gomes et al., 2004), uma vez que a aplicação manual permite o aumento progressivo da amplitude de movimento conforme ocorre o relaxamento viscoelástico do tecido.

6.2 Massa Corporal

No presente estudo, foi observado que houve diminuição da massa corporal em torno de 10% no grupo apenas imobilizado, e em torno de 20% nos grupos imobilizados e alongados. Resultado semelhante foi encontrado por

Coutinho et al. (2004) que observaram 12% de diminuição da massa corporal no grupo imobilizado e 17% no grupo imobilizado e alongado.

A diminuição da massa corporal está provavelmente relacionada com o grau de estresse do animal provocado pelo modelo de imobilização, além da possível diminuição da síntese protéica corporal em resposta a hipoatividade (Kannus et al., 1998; Ansved, 1995). A diminuição mais acentuada da massa corporal dos animais dos grupos submetidos ao alongamento deve-se, provavelmente, ao aumento do estresse do animal devido a aplicação diária de anestesia para a realização do alongamento.

A associação de recursos térmicos não influenciou nas alterações da massa corporal dos animais, uma vez que a perda de massa dos grupos IV e G não foi diferente do grupo somente alongado. Resultado este semelhante ao do estudo de Usuba et al. (2006) que não observou diferenças com relação à massa corporal entre animais tratados apenas com alongamento e alongamento associado com recurso térmico infra-vermelho.

6.3 Massa Muscular

A imobilização resultou em diminuição da massa muscular, como pode ser observado no grupo apenas imobilizado, que apresentou valor de massa muscular menor que o grupo controle. Esse resultado está de acordo com os achados de Witzmann e colaboradores (1982), Gamrin e colaboradores

(1998) e Harjola e colaboradores (2000), que sugerem que a hipocinesia leva a uma diminuição da síntese protéica e aumento da degradação da mesma, diminuindo a massa muscular.

No presente estudo, observou-se que o alongamento sem associação de recursos foi eficiente em reverter a perda de massa muscular causada pela imobilização, uma vez que o grupo somente alongado apresentou valor de massa muscular semelhante ao grupo controle. Este resultado está de acordo com o de Williams (1990), no qual observou que o grupo submetido a alongamento por 30 minutos diários no músculo sóleo de rato apresentou apenas 9% de perda de massa muscular, comparado com 48% de perda, observada no grupo apenas imobilizado por 2 semanas. Segundo Dix e Eisenberg (1990), o alongamento promove acúmulo de RNAm na região miotendínea, favorecendo a síntese de proteínas contráteis. Sendo assim, acredita-se que o alongamento previne diminuição da massa muscular que ocorre após imobilização e induz o crescimento do tecido (Goldspink, 1977; Savolainen et al., 1988).

A associação de recursos térmicos ao alongamento não reverteu a atrofia muscular, como observado no grupo somente alongado. Este resultado difere dos de Usuba e colaboradores (2006), que não observaram diferenças com relação à massa muscular quando comparados o grupo apenas alongado com grupo alongado e associado ao infra-vermelho.

Os resultados do presente estudo sugerem que os recursos térmicos aplicados, associados ao alongamento, interferem de forma negativa na

recuperação da massa muscular, não sendo conhecidos os mecanismos envolvidos nesse processo.

6.4 Amplitude de Movimento

Inicialmente os grupos apresentaram ADM semelhante, mostrando homogeneidade entre os grupos.

Os resultados deste estudo mostraram que em um período de 14 dias de imobilização ocorreu diminuição da ADM em torno de 45% nos grupos A, IV e G. Esta diminuição foi similar ao valor encontrado por Williams (1988), que observou redução de aproximadamente 42% da ADM em animais imobilizados por um período de 10 dias, também na posição encurtada. Já Okita et al. (2004), observaram que após uma semana de imobilização houve diminuição de 22% na ADM, sendo esta diminuição dependente do tempo, uma vez que após 2 semanas a mesma foi de 32%.

No presente estudo, durante o período de alongamento, houve pequeno aumento da ADM nos grupos A, IV e G, entretanto, ao final do experimento foi observado que nenhum dos tratamentos foi eficiente em reverter a perda da mesma após imobilização, não havendo diferenças entre os grupos alongados e o grupo imobilizado.

Sabe-se que a imobilização em posição de encurtamento promove, dentre outras alterações, a diminuição do número de sarcômeros em série, aumento na densidade de área de tecido conjuntivo intramuscular e alterações

articulares, fatores estes que influenciam a ADM (Tabary et al., 1972; Williams e Goldspink, 1984; Renner et al., 2006). No presente trabalho, foi observado aumento na densidade de área de tecido conjuntivo em todos os grupos submetidos à imobilização, o que pode ter contribuído para a diminuição da amplitude de movimento nestes grupos.

Resultados diferentes do presente estudo foram observados por Okita e colaboradores (2001), no qual o alongamento de 30 minutos, aplicado por 7 dias após um período de 4 semanas de imobilização, aumentou em 50% a ADM do tornozelo dos animais. Contudo, os animais permaneceram sem órtese durante os 7 dias de alongamento, sendo a deambulação espontânea fator importante para o retorno da ADM normal.

Já Williams (1988), observou que animais imobilizados por 10 dias e alongados a cada dois dias por 15 minutos não apresentaram valor de ADM normal ao final do experimento, entretanto apresentaram diferença significativa quando comparado com o grupo imobilizado. Desta forma, os autores concluem que o protocolo de alongamento aplicado foi eficiente em minimizar os efeitos da imobilização na redução da ADM. Em outro estudo, Williams (1990) mostrou que alongamento diário, aplicado durante 2 semanas de imobilização na posição encurtada, com duração de pelo menos 30 min e iniciado no primeiro dia de imobilização, foi eficiente na manutenção da ADM normal do tornozelo. Do mesmo modo que o presente estudo, ambos trabalhos citados aplicaram o alongamento durante o período de imobilização, sendo a órtese recolocada ao final de cada sessão.

As diferenças encontradas entre os trabalhos citados e o atual podem ser explicadas pelo fato de que os trabalhos de Williams (1988; 1990) utilizaram períodos menores de imobilização, 10 e 14 dias respectivamente, enquanto que no presente estudo o sóleo foi submetido a encurtamento por três semanas e, segundo Okita e colaboradores (2004), quanto mais tempo a órtese permanecer aplicada, maior será a redução da amplitude de movimento.

Além disso, nos trabalhos citados, os animais foram submetidos ao alongamento já no primeiro dia de imobilização, enquanto que no atual estudo o alongamento iniciou-se apenas no 15º dia de experimento. Esta diferença no início do tratamento pode ter influenciado os resultados encontrados.

Os grupos que tiveram recurso térmico associado ao alongamento apresentaram valor final de ADM menor que o grupo somente alongado, mostrando que a associação de recursos térmicos interferiu negativamente no alongamento. Além disso, o grupo G apresentou ainda valor de ADM menor que o grupo IV.

Brodowicz, Welsh e Wallis (1996) mostraram que o alongamento associado simultaneamente ao gelo, e aplicado por 20 minutos, foi mais eficiente em aumentar a ADM do músculo isquiotibial de humanos quando comparado ao grupo alongado e associado ao calor ou somente alongado. As disparidades entre os protocolos utilizados no presente estudo e no de Brodowicz, Welsh e Wallis (1996) podem explicar as diferenças nos resultados, uma vez que, neste último, o alongamento foi aplicado em humanos e sendo observadas apenas as

alterações musculares agudas (segundos ou minutos após as sessões de alongamento) e não as alterações crônicas (mais de um dia após a sessão).

Knight (2000) afirma que a associação de resfriamento e alongamento é prejudicial no aumento da flexibilidade do tecido conjuntivo, uma vez que a diminuição da temperatura aumenta a rigidez do tecido conjuntivo e, conseqüentemente, diminui sua extensibilidade. Entretanto, esse aumento da rigidez do tecido conjuntivo é observado imediatamente após o resfriamento, sendo a diminuição da extensibilidade uma resposta aguda ao alongamento, o que difere do presente estudo, onde foi estudada a alteração crônica do alongamento.

Com relação ao aquecimento, Sapega, Quedenfeld e Moyer (1981) afirmam que com o aumento da temperatura do tecido conjuntivo, as características biomecânicas do colágeno se alteram para aumentar o deslizamento entre si das fibras colágeno, levando ao aumento da extensibilidade do tecido conjuntivo, bem como da amplitude de movimento. Contudo, essas alterações também caracterizam a fase de resposta aguda, diferente do presente estudo.

O alongamento associado ou não a recurso térmico não foi eficiente em reverter as alterações causadas pela imobilização na ADM, sendo vários os fatores que podem ser responsáveis por isso, como a alteração nas estruturas da articulação ou pela falta de elasticidade do tecido conjuntivo, uma vez que todos os grupos alongados tiveram densidade de tecido conjuntivo maior que o grupo controle. Além disso, estruturas como titina e desmina, responsáveis pela

resistência que influencia a extensibilidade muscular, podem ter sofrido alterações devido a imobilização, contribuindo, desta forma, para os resultados encontrados no presente estudo.

6.5 Adaptações do Sarcômero

Não foram encontradas diferenças quando comparados os grupos que receberam alongamento com o grupo controle, mostrando que o protocolo de alongamento aplicado fora eficiente em reverter a perda de comprimento muscular. Entretanto, foi observado que o grupo I apresentou valores menores que o grupo C e G, mostrando que a imobilização comprometeu o comprimento muscular.

Com relação a extensão do sarcômero, o grupo imobilizado apresentou maior extensão que os grupos controle e alongado. Segundo Williams e Goldspink (1978) o aumento no comprimento do sarcômero de um músculo imobilizado na posição de encurtamento ocorre devido à perda de sarcômeros em série, fazendo com que os sarcômeros restantes alonguem-se até um comprimento que permita o músculo desenvolver máxima tensão na posição imobilizada. Isso explica o resultado do presente estudo uma vez que o grupo imobilizado teve perda do número de sarcômeros.

Do mesmo modo que as fibras musculares adaptam-se à posição de encurtamento, o alongamento também provoca adaptações musculares. Segundo Caiozzo e colaboradores (2002) as fibras musculares podem se

adaptar ao alongamento por meio de um aumento no comprimento do sarcômero, um crescimento longitudinal da fibra pela adição de sarcômeros em série, ou por ambos.

De acordo com Caiozzo e colaboradores (2002), a sarcomerogênese só ocorre se o estímulo de alongamento aumentar a extensão do sarcômero até um determinado ponto, conhecido como *set point*. Neste experimento, os autores submeteram o músculo sóleo de rato a diferentes intensidades de tração, sendo observado que a sarcomerogênese iniciou-se somente quando a extensão do sarcômero atingiu 2.6 a 2.7 μ m, sendo este valor considerado o *set point* para este músculo. Importante ressaltar que o estudo de Caiozzo e colaboradores (2002) foi o único encontrado na literatura apresentando valor de *set point* para a sarcomerogênese, não estando definido se este valor de *set point* é específico para o músculo sóleo de rato.

No presente estudo, todos os grupos submetidos ao alongamento apresentaram aumento do número de sarcômero quando comparado ao grupo imobilizado, sugerindo que o alongamento aplicado atingiu o valor do *set point* para o músculo sóleo, o que provocou a sarcomerogênese da fibra muscular. Além disso, pode-se inferir que a sarcomerogênese não foi comprometida com a aplicação do resfriamento ou do aquecimento, uma vez que os grupos IV e G apresentaram resultados semelhantes ao grupo somente alongado.

Por outro lado, a adaptação da extensão dos sarcômeros foi distinta entre o grupo alongado e os submetidos aos recursos térmicos. Enquanto o grupo alongado apresentou menor extensão dos sarcômeros, os grupos IV e G

apresentaram valores semelhantes quando comparados ao grupo imobilizado. Contudo, sabe-se que esta adaptação ocorre para permitir melhor interdigitação dos filamentos contráteis, a fim de permitir o desenvolvimento de tensão muscular máxima (Williams e Goldspink, 1978).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com Williams (1990) que mostrou que sessões diárias de alongamento passivo aplicados por 30 minutos no músculo sóleo encurtado de ratos foram suficientes para prevenir a perda de sarcômeros em série. Recentemente, foi também observado que sessões de alongamento aplicadas 3 vezes por semana por 40 minutos resultou em aumento do número de sarcômeros em série (Coutinho et al., 2004).

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no crescimento longitudinal, entretanto é bem estabelecido que o alongamento provoca aumento na expressão do fator de crescimento insulínico (IGF) e fator de crescimento mecânico (MGF), sendo este último fator uma variante do IGF sintetizado pelo músculo esquelético (Goldspink, 1999; Goldspink, Williams e Simpson, 2002).

Além disso, estudos mostram que uma isoforma do óxido nítrico neuronal está envolvida na regulação do número de sarcômeros em série. O óxido nítrico 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). O óxido nítrico neuronal parece influenciar na síntese de proteínas do citoesqueleto (Bishopric, Javaseka e Webster, 1992) e na fusão de células satélites na extremidade da célula

muscular, eventos estes que ocorrem durante a adição de sarcômeros (Williams e Goldspink, 1971).

6.6 Área de Secção Transversa

Após o período experimental observou-se redução da área de secção transversa das fibras musculares no grupo imobilizado. 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 et al., 2006; Gomes et al., 2007). Segundo Edgerton e colaboradores (2002), 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.

A atrofia muscular é um processo com inúmeras alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que se 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), 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).

Outro fator que pode estar envolvido no processo de atrofia é uma

das vias de degradação ubiquitina-proteossomo, uma vez que essa via apresenta-se ativada como resultado da imobilização articular (Taillander et al., 1996; Bodine et al., 2001).

Já o grupo alongado apresentou AST semelhante ao grupo controle, mostrando que o alongamento foi eficiente em reverter a atrofia muscular causada pela imobilização.

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 fatores miogênicos regulatórios (Lowe, Lund e Alway, 1998).

Estudos mostram que o alongamento é eficaz em aumentar a expressão gênica da myoD, fator regulatório miogênico, sugerindo que este estímulo esteja relacionado com a hipertrofia (Zador, Dux e Wuytack, 1999).

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

Coutinho e colaboradores (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 no estudo de Coutinho et al. (2004) mostraram que o procedimento aplicado não retornou a AST aos valores iniciais, porém, foi eficiente para reduzir a atrofia muscular.

Em estudo semelhante realizado por Gomes e colaboradores (2004), os autores avaliaram a resposta muscular ao protocolo de alongamento com duração de 40 minutos, por um período de três semanas, porém, com alongamento aplicado apenas uma vez por semana. Os autores observaram que o protocolo utilizado não foi eficiente em retornar a AST a seus valores iniciais, porém, reduziu a atrofia muscular.

Ao comparar os resultados encontrados no presente estudo com os resultados encontrados por Coutinho e colaboradores (2004) e Gomes e colaboradores (2004) podemos concluir que, devido as diferenças nos protocolos de alongamento aplicados, o presente estudo mostrou-se mais eficiente uma vez que, além de reduzir a atrofia muscular, resultou no retorno da AST a seus valores iniciais.

Dentre os grupos que tiveram algum recurso associado, apenas o grupo que recebeu aplicação de gelo foi eficiente em minimizar a atrofia muscular, mostrando AST maior que o grupo imobilizado.

Portanto, os grupos alongados com associação de recursos térmicos não foram eficientes em reverter a atrofia muscular, como observado no grupo

somente alongado. Estes resultados sugerem que as alterações causadas pelo resfriamento ou aquecimento não auxiliam o alongamento em promover crescimento radial da fibra muscular, não sendo conhecidos os mecanismos envolvidos nesse processo.

6.7 Densidade do Tecido Conjuntivo

O grupo imobilizado apresentou densidade de área de tecido conjuntivo maior que o grupo controle, mostrando que a imobilização resultou em aumento do tecido conjuntivo. O mesmo resultado foi encontrado em trabalhos prévios de Williams et al. (1988) e Williams e Goldspink (1984), que observaram aumentos significativos de perimísio e endomísio em músculo imobilizado na posição de encurtamento.

Em situação de imobilização, Amiel e colaboradores (1982) observaram alterações do metabolismo de colágeno nos tecidos conjuntivos, decorrentes da falta de forças fisiológicas atuando sobre ele. Segundo Wang e colaboradores (2007), cargas mecânicas possuem papel importante na manutenção da homeostase do tecido conjuntivo. Os fibroblastos do tecido conjuntivo convertem sinais mecânicos em uma série de eventos biológicos, como a expressão de vários genes, influenciando o tecido conjuntivo de forma fisiológica e até mesmo patológica, portanto, a ausência de cargas mecânicas leva a alteração da homeostase.

Williams e Goldspink (1984) realizaram imobilização em posição de

encurtamento do músculo sóleo de ratos por um período de 4 semanas, e observaram que a imobilização na posição encurtada pode causar alteração não somente na quantidade, mas também no ângulo de fixação das fibras colágeno do perimísio, causando diminuição na elasticidade muscular e aumento da tensão passiva. Os autores relatam que o aumento na densidade de área do tecido conjuntivo em músculo imobilizado ocorre pela redistribuição do mesmo devido ao encurtamento das fibras musculares.

No entanto, em novo estudo, Williams e Goldspink (1988) observaram que o acúmulo de tecido conjuntivo ocorre devido a diminuição da atividade contrátil. Os autores avaliaram a densidade do tecido conjuntivo intramuscular após período de sete dias de imobilização e imobilização associada a contração muscular induzida pela 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. Já Williams (1988), analisou 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, e também observou que o mesmo foi capaz de prevenir o aumento da densidade de tecido conjuntivo.

No presente estudo, o alongamento aplicado isoladamente não foi efetivo para reverter as alterações no tecido conjuntivo, sendo este resultado diferente do relatado por Williams (1988). Entretanto, as diferenças nos protocolos de alongamento e imobilização entre o presente estudo e o de Williams (1988), podem explicar os resultados contraditórios.

O grupo que recebeu aplicação de gelo foi o único que mostrou-se diferente de todos os outros grupos alongados, sugerindo que de alguma forma o gelo foi eficiente em minimizar o aumento do tecido conjuntivo após imobilização.

O efeito da temperatura na extensibilidade do tecido conjuntivo é conhecido. Sabe-se que alta temperatura aumenta a extensibilidade do tecido enquanto baixa temperatura a diminui, devido ao fato de que a viscosidade do tecido conjuntivo é influenciada pela temperatura tecidual. (Alter, 1999). No entanto, os mecanismos envolvidos na influência da temperatura sobre a densidade de tecido conjuntivo, como observado no presente estudo, são desconhecidos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que músculos encurtados podem adaptar-se ao alongamento, sendo esta adaptação dependente da aplicação do alongamento sozinho ou associado a recursos térmicos. O protocolo de alongamento aplicado foi eficiente em reverter a sarcopenia, independente da aplicação de frio ou termoterapia. Embora a adaptação de sarcômero pareça não ser dependente do aquecimento e resfriamento muscular, a alteração na densidade de tecido conjuntivo mostrou-se responsiva somente ao alongamento associado ao resfriamento, enquanto a área de secção transversa das fibras respondeu com adaptações ao alongamento aplicado sozinho ou com associação de crioterapia. Mais estudos são necessários para entendimento das respostas fisiológicas que ocorrem no músculo quando o alongamento é aplicado com associação de recursos térmicos.

REFERÊNCIAS*

Alter MJ. Ciência da flexibilidade. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.

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.

Amiel D, Woo SLY, Harwood FL, Akeson WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. *Acta Orthop Scan* 1982; 53: 325-332.

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

Antonio J, Gonyea WJ. Role of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia in intermittently stretched avian muscle. *J App Physiol.* 1993; 74: 1893-8.

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

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

Bishopric NH, Javaseka V, Webster KA. Positive regulation of the skeletal α -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.

Brasileiro JS, Faria AF, Queiroz LL. Influência do resfriamento e do aquecimento local na flexibilidade dos músculos isquiotibiais. *Rev Bras Fisioter.* 2007; 11(1): 57-61.

Brodowicz, GR, Welsh, R, Wallis, J. Comparison of stretching with ice, stretching with heat, or stretching alone on hamstring flexibility. *J Athl Train.* 1996; 31(4): 324-27.

Brucker JB, Knight KL, Rubley MD, Draper DO. An 18-day stretching regimen, with or without pulsed, shortwave diathermy, and ankle dorsiflexion after 3

weeks. *J Athl Train.* 2005; 40(4): 276-80.

Burke DG, Holt LE, Rasmussen R, Mackinnon NC, Vossen JF, Pelham TW. Effects of hot or cold water immersion and modified proprioceptive neuromuscular facilitation flexibility exercise on hamstring length. *J Athl Train.* 2001; 36(1): 16-19.

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.

Chambers R. Clinical uses of cryotherapy. *Phys Ther.* 1969; 49: 245-9.

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.

Cornelius WL, Ebrahim K, Watson J, Hill DW. The effects of cold application and

modified PNF stretching techniques on hip joint flexibility in college males. *Res Q Exerc Sport*. 1992; 63: 311-4.

Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat limb. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35: 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: 1853-61.

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

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

Draper DO, Miner L, Knight KL, Ricard MD. The carry-over effects of dithermy and stretching in developing hamstring flexibility. *J Athl Train*. 2002; 37: 37-42.

Dutton M. *Fisioterapia Ortopédica*. Porto Alegre: Artmed; 2006.

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.

Frost HM. *Introduction to biomechanics.* Springfield,IL: Charles C Thomas; 1967.

Apud Alter MJ. *Ciência da flexibilidade.* Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.

Furst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: A map of ten nonrepetitive epitomes starting at the Z-lines extends close to the M line. *J Cell Biol.* 1988; 106(5):1563-72.

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

Gamrin L, Berg HE, Essen P, Tesch PA, Hultman E. The effect of unloading protein synthesis in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1998;163: 369-77.

Garde RE. Cervical traction: The neurophysiology of lordosis and the theological characteristics of cervical curve rehabilitation. In D.D. Harrison (Ed.), *Chiropractic: The physics of spinal correction.* Sunnyvale, CA:Author. 1988: 535-659.

Goldspink DF. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of

rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1977; 264: 267-82.

Goldspink G. The adaptation of muscle to a new functional length. *Mastication.* 1976: 90-9.

Goldspink, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat.* 1999; 194: 323-34.

Goldspink G, Williams PE. The nature of the increased passive resistance in muscle following immobilization of the mouse soleus muscle. *J Physiol.* 1979; 289: 55.

Goldspink G, Williams P, Simpson H. Gene expression in response to muscle stretch. *Clin Orthop Res.* 2002; 402: 146-52.

Gomes AR, 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: 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.

Grounds MD. Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology*. 2002; 3: 19-24.

Halvorson GA. Therapeutic heat and cold for athletic injuries. *Phys Sportsmed*. 1990; 18: 87-92.

Han XY, Wng W, Komulainen J, Koskinen SO, Konaven V, Vihko V, et al. Increased mRNAs procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. *Pflugers Arch*. 1999; 437: 857-64.

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.

Heyward VH. *Designs for fitness*. Minneapolis: Burges; 1984.

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

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279: 1235-41.

Horowitz R. Passive force generation and titin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Biophys J*. 1992; 61: 392-8.

Itoh Y, Susuki T, Kimura S, Ohashi K, Higuchi H, Sawada H, et al. Extensible and less-extensible domains of connectin filaments in stretched vertebrate skeletal muscle as detected by immunofluorescence and immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies. *J Biochem*. 1988; 104: 504-8.

Jarvinen TA, Józsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Jarvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002; 23: 245-54.

Józsa L, Kannus P, Thorig J, Reffy A, Jarvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopy study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br*. 1990; 72: 298-7.

Kannus P, Józsa L, Jarvinen TL, Kvist M, Vieno T, Jarvinen TA, et al. Free mobilization and low to high intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol*. 1998; 84: 1418-24.

Kisner C, Colby LA. Exercícios terapêuticos. Fundamentos e técnicas. São

Paulo: Manole; 1992.

Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004; 84: 649-98.

Knight KL. Crioterapia no tratamento das lesões esportivas. São Paulo: Manole; 2000.

Laban MM. Collagen tissue: Implication of its response to stress in vitro. *Arch Phys Med Rehabil.* 1962; 43: 461-5. Apud Alter MJ. *Ciência da flexibilidade.* Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.

Lehmann JF, Warren CG, Scham SM. Therapeutic heat and cold. *Clin Orthop.* 1974; 99: 207-45.

Lentell G, Hetherington T, Eagan J, Morgan M. The use of thermal agents to influence the effectiveness of a low-load prolonged stretch. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1992; 16: 200-7.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation.* Philadelphia: Lippincott, USA; 2002.

Lowe DA, Lund T, Always SE. Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory

factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails. *Am J Physiol Cell.* 1998; 275: 155-62.

Magnusson SP, Aagaard P, Nielson JJ. Passive energy return after repeated stretches of the hamstring muscle tendon unit. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32: 1160-4.

Mason T, Rigby BJ. Thermal transition in collagen. *Biochim Biophys Acta.* 1963; 79: 448-50. Apud Alter MJ. *Ciência da flexibilidade.* Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.

Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc* 1981; 121: 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.

McDonough AL. Effects of immobilization and exercise on articular cartilage: A review of literature. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1981; 3: 2-5.

Minton J. A comparison of thermotherapy and cryotherapy in enhancing supine extended-leg, hip flexion. *J Athl Train.* 1993; 28: 172-6.

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 Electron 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 rat soleus muscle. 2004; 25: 159-66.

Olson JE, Stravino VD. A review of cryotherapy. *Phys Ther.* 1972; 52: 840-53.

Peres SE, Draper DO, Knight KL, Ricard MD. Pulsed shortwave diathermy and prolonged long-duration stretching increase dorsiflexion range of motion more than identical stretching without diathermy. *J Athl Train.* 2002; 37(1): 43-50.

Pollack GH. Muscles and molecules: Uncovering the principles of biologic motion. Seattle: Ebner & Sons. 1990. Apud Alter MJ. Ciência da flexibilidade. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.

Prentice WE. Modalidades Terapeuticas em Medicina Esportiva. São Paulo: Manole; 2002.

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.

Purslow PP. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. Comp Biochem Physiol. 2002; 133: 947-66.

Ramachandran GW. Structure of collagen at the molecular level. Treatise of collagen. 1967; 1: 103-79.

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.

Rigby B. The effect of mechanical extension under thermal stability of collagen. *Biochim Biophys Acta*. 1964; 79: 634-6. Apud Alter MJ. *Ciência da flexibilidade*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.

Rigby BJ, Hirai N, Spikes JD, Eyring J. The mechanical properties of rat tail tendon. *J Gen Physiol*. 1959; 43: 265-83. Apud Alter MJ. *Ciência da flexibilidade*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.

Rosário JL, Marques AP, Maluf AS. Aspectos clínicos do alongamento: uma revisão de literatura. *Ver Brás Fisioter*. 2004; 8: 83-8.

Russell B, Motlagh D, Ashley WW. Form follows functions: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol*. 2000; 88: 1127-32.

Salonen V, Lehto M, Kalimo M, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve*. 1985; 8: 125-31.

Sapega AA, Quedenfeld TC, Moyer RA, Butler RA. Biophysical factors in range of motion exercise. *Phys Sportsmed*. 1981; 9: 57-65.

Savolainen J, Vaananen K, Vihko V, Puranen J, Takala TES. Effect of

immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1987; 252: 883-8.

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. *Phys Sports Med.* 2000; 28(8): 57-62.

Smith LK, Weiss EL, Lehmkuhl C. *Cinesiologia Clínica de Brunnstrom.* São Paulo: Editora Manole; 1997.

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.

Spector SA, Simard CP, Fournier M, Sternlicht E, Edgerton VR. Architectural alterations of rat hindlimbs skeletal muscles immobilized at different lengths. *Exp Neurol.* 1982; 76: 94-110.

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.

Taillander D, Aourousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, et al. Coordinate activation of lysosomal, Ca^{2+} -activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J.* 1996; 316: 65-72.

Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand Med Sci Sports.* 2000; 10: 321-5.

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.

Taylor DC, Dalton JD, Seaber AV, Garret WE. Viscoelastic properties of muscle-

tendon units: The biomechanical effects of stretching. *Am J Sports Med.* 1990; 18: 300-9.

Taylor B, Waring C, Brashear T. The effects of therapeutic application of heat or cold followed by static stretch on hamstring muscle length. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1995; 21: 283-6.

Urry DW. Protein elasticity based on conformations of sequential polypeptides: The biological elastic fiber. *J Prot Chem.* 1984; 3: 403-36.

Usuba M, Miyanaga Y, Miyakawa S, Maeshima T, Shirasaki Y. Effect of heat in increasing the range of knee motion after the development of a joint contracture: an experiment with an animal model. *Arch Phys Med Rehabil.* 2006; 87: 247-53.

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.* 1991; 88: 7101-5.

Wang JHC, Thampatty BV, Lin JS, Im HJ. Mechanoregulation of gene expression in fibroblast. *Gene.* 2007; 391: 1-15.

Woo SLY, Young EP. Structure and function of tendons and ligaments. 1991.

Apud Rosário JL, Marques AP, Maluf AS. Aspectos clínicos do alongamento: uma revisão de literatura. *Ver Brás Fisioter.* 2004; 8: 83-8.

Weiss L, Greep RO. *Histology.* New York: Elsevier Biomedical; 1983.

Williams PE. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. *Ann Rheum Dis.* 1988; 47: 1014-6.

Williams PE. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcômero loss in immobilized muscle. *Ann Rheum Dis.* 1990; 49: 316-7.

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): 751-61.

Williams PE, Goldspink G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibers. *J Anat.* 1973; 116: 45-55.

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 sarcômero length and physiological properties in immobilized muscle. *J Anat.* 1978; 127: 459-68.

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

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

Witzmann FA, Kim DH, Fitts RH. Hindlimb immobilization: length-tension and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1982; 53, 335-45.

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.

Zador E, Dux L, Wuytack F. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. *J Muscle Res Cell Motil.* 1999; 20: 395-402.

Ceccotti HM, Sousa DD. Manual para normalização de dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, UNIMEP; 2006. Disponível em <http://www.unimep.br/ppgft>