



*Universidade Federal
de São Carlos*

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOTERAPIA**

**ADAPTAÇÕES MUSCULARES O E NO TECIDO CONJUNTIVO
INTRAMUSCULAR ASSOCIADA AO ALONGAMENTO PASSIVO**

ELIANE DE LIMA COUTINHO

SÃO CARLOS –SP

2006

**ADAPTAÇÕES MUSCULARES O E NO TECIDO CONJUNTIVO
INTRAMUSCULAR ASSOCIADA AO ALONGAMENTO PASSIVO**

por

ELIANE DE LIMA COUTINHO

Dissertação de doutorado apresentada

ao Programa de Pós-Graduação em
Fisioterapia da Universidade Federal
de São Carlos, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutora em Fisioterapia.

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. TANIA DE FÁTIMA SALVINI

São Carlos – SP

Abril -2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C871am

Coutinho, Eliane de Lima.

Adaptações musculares e no tecido conjuntivo intramuscular associada ao alongamento passivo / Eliane de Lima Coutinho. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
161 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Exercícios terapêuticos. 2. Exercícios de alongamento.
3. Encurtamento muscular. 4. Imobilização. I. Título.

CDD: 615.824 (20^a)

**ADAPTAÇÕES MÚSCULARES O E NO TECIDO CONJUNTIVO
INTRAMUSCULAR AO ALONGAMENTO PASSIVO.**

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof^ª. Dr^ª. Tania de Fátima Salvini – Orientadora

Prof^ª. Titular do Departamento de Fisioterapia

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

São Carlos- São Paulo

Prof^ª. Dr^ª. Stela Márcia Mattiello Rosa

Prof^ª. Adjunto do Departamento de Fisioterapia

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

São Carlos- São Paulo

Prof. Dr. Benedicto Campos Vidal

Prof. Titular do Departamento de Biologia Celular

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Campinas– São Paulo

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Prof. Adjunto do Departamento de Biologia Celular

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Campinas– São Paulo

Prof^a. Dr^a. Amélia Pasqual

Prof^a. Adjunto do Departamento de Fisioterapia

Universidade do Estado de São Paulo – USP

São Paulo – SP

SUPLENTE:

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto

Prof. Adjunto do Departamento de Fisioterapia

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos- São Paulo

Profª Drª Maeli Dal Pai Silva

Profª Titular do Departamento de Morfologia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu - São Paulo

Profª. Drª. Ana Cláudia Mattiello-Sverzut

Profª. Adjunto do Departamento de Fisioterapia

Universidade do Estado de São Paulo – USP, Ribeirão Preto – SP

Profª. Drª. Maria Alice da Cruz Holfling

Profª Adjunto do Departamento de Biologia

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas - São Paulo

Prof Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos

Profª Adjunto do Departamento de Anatomia

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas - São Paulo

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina".

(Cora Coralina)

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, **José Miranda e Maria José.**

Mestres da minha vida, iluminaram meu
Caminho para chegar até aqui... sem vocês tudo
seria incompleto... vocês fizeram desse projeto
de vida uma conquista especial...

A uma amiga inesquecível, **Elineide Hilário (In Memória)**

Que tanto me incentivou e sonhou junto...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

MINHA ORIENTADORA

Prof^a Tania

Muitas vezes muito mais que orientadora...

Ensinou-me muito mais que ser pesquisadora, me ensinou a ter coragem de buscar... de errar... de reconhecer... de lutar... de ganhar e de perder... mas nunca desistir.

Ensinou-me os caminhos dos rios e as técnicas mais apuradas de pesca... Agora sozinha vou tentar seguir tudo que me ensinou... e fazer grandes pescarias.

Obrigada por está em minha vida... e me tornar alguém melhor.

Você é, e será sempre inesquecível para mim...

GRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof Vidal Campos

Por me ensinar os critérios da pesquisa... por ser um pesquisador disposto a alfabetizar, ensinando exaustivamente tudo que sabe... por abrir o seu laboratório e desprender incontáveis horas de ensino para comigo...

Obrigada pelos ricos ensinamentos de pesquisa e de vida...

Orgulho-me de tê-lo conhecido...

A Viagem

Aos meus Pais, por serem a minha *carta náutica*.

À minha família, por serem o meu *talismã*.

Aos meus Amigos, por formarem a *melhor tripulação do mundo*.

À Dra. Tânia Salvini, por ser o melhor *Capitão de bordo*.

À Anna Raquel, por ser a melhor *companheira de bordo*.

À Carol e Camila por serem os *meus lemes*.

Olga e Isaura, por serem os *meus portos seguros*.

Aos docentes do Departamento de Fisioterapia, por serem a *minha caravela*.

O meu sincero Obrigado,

Agora que findo esta primeira grande viagem pelo mundo da fisioterapia

AGRADECIMENTOS:

Especialmente A Deus pelo presente de Tê-lo conhecido, por ter me sustentado, amparado e enchido de bênçãos minha estadia em São Carlos.

A Minha Maravilhosa Família, em especial meus amados pais, minha irmã querida Cris, meus irmãos Jorge e Alex por me apoiarem mesmo de longe e torcerem juntos pelas minhas conquistas, amo vocês!

Aos meus sobrinhos Andreza, Adrieli, Bia, Alexia, Hiago, Diego e Igor pelos abraços maravilhosos quando nos víamos, que delícia! !

A Minha Amiga Irmã Olga e amiga sobrinha Giu por serem minha família aqui em SC e por cuidarem de mim e consolar-me em todos os momentos de angústia e pelas ótimas risadas... amo vocês!! OBRIGADA

Minha Grande Amiga Isa, às vezes mãe, irmã amigas, mas sempre presente. Obrigado pelo seu colo quando chequei...Você é especial em minha vida! Inesquecível. A Lu, Laura e Dé por também me acolheres em sua casa !

Ao meu querido Rubens, um homem especial em minha via, que me apóia sempre que preciso e por seu amor sem limites, obrigada querido!

A Anna Raquel por ser uma parceira de laboratório em toda fase do mestrado e parte do doutorado, fomos um duplas dinâmica, obrigado Anninha!

A Carol, Camila alunas de IC pelo coleguismo e dedicação comigo e com o nosso trabalho.

As amigas da UNICAMP Flávia, Fernanda, Tati e Marcela pelo acolhimento nas minhas estadias no laboratório e pala ajuda nas correções dos artigos.

Meus amigos do laboratório, Jamilson, Anna, Quel, Thiago, Adriana, Lúcia, Rodrigo, Paula, Sabrina, Jamacy, Dório e João pelo ajuda e papos descontraídos quando mais precisei.

Aos meus mestres da pós-graduação pela oportunidade de conhecer o mundo da Pesquisa, vocês são os melhores!

A Tereza, pelos ensinamentos e cumplicidade nas horas de trabalho duro, obrigada Te!

A Paulinha a secretária mais quebra galho que já conheci e sempre solícita.

A Banca examinadora desta tese por aceitarem participar e colaborar com o meu crescimento científico.

Aos meus vizinhos mais que vizinhos, Sônia meu abraço e cuidado de mãe, Aline irmãzinha, Vanessa e Claudinho pelo sorriso sempre aberto e Cláudio pela ajuda sempre que precisei..

A amiga Graça, pela torcida lá de Aracaju e pelo carinho.

Aos amigos Rose, Marcos (meu adorável professor de Inglês), Fais, Junior, Flavio, Beto e Fernando por todo carinho nestes anos todos.

A Ana Maria pelas aulas maravilhosas de inglês e pelo café delicioso.

Aos amigos dos outros laboratórios, Davi, Wolber, Paulo, Charles, Livia, Natália (nova Amiga), Flávia e Aline pelos papos descontraídos.

Aos meus primos Laurinha e Evandro por recebem tão bem em Campinas e trazer de volta ao lar.

A Paty e Vivi que me ensinaram muito do pouco que sei de bancada e de fazer amigos.

Aos alunos da graduação pela boa energia e atenção nas minhas aulas, aprendi muito!

Ao Revar e Roberto do biotério, sem vocês nada seria feito.

A CASPES e a FAPESP por me financiarem por 5 anos.

E por fim, mas não menos importante, A UFSCar por abrir a porta de um GRANDE SONHO!

SUMÁRIO

1- BREVE INTRODUÇÃO	15
2- OBJETIVO GERAL	16
3- APRESENTAÇÃO	17
4- MANUSCRITOS 1	19
Curtas Sessões de Alongamento Passivo após Imobilização no Músculo Sóleo de Ratos Aumentam a Organização Macromolecular do Colágeno e Área das Fibras Musculares.	
5- MANUSCRITOS 2	52
Dez minutos diários de alongamento intermitente aumentam a área da fibra muscular e o número de sarcômeros em série no músculo sóleos encurtados de ratos após a imobilização.	
6- MANUSCRITOS 3	85
Adaptação do músculo sóleo de ratos durante 4 semanas de alongamento intermitente passivo: Análise morfologia da fibra muscular e da organização macromolecular do colágeno	
7- CONCLUSÕES GERAIS	120
8- BIBLIOGRAFIA	121
9- ANEXO	129
9-1. Manuscrito 1 – Versão em Inglês.	130
9-2. Artigos Publicados	161

1- BREVE INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, muitos trabalhos tem sido realizado no sentido de esclarecer o efeito do alongamento em músculos normais e encurtados pós-imobilização. Esse tem sido um assunto de profundo interesse de fisioterapeutas bem como de educadores físicos e médicos esportistas. Vários trabalhos em músculos humanos têm investigado o efeito da imobilização e do alongamento muscular passivo na amplitude de movimento (ADM), no torque passivo e no stress de relaxação (Kannus, 1988, Feland et al. 2001; Norkin, 1995; Gajdosik, 2001), assim como estudos básicos em animais tem investigado o efeito da imobilização e do alongamento muscular passivo de longa duração o trofismo muscular (Goldspink, 1977; Williams, 1988; Williams, 1990, Gomes et al, 2004, Coutinho et al, 2004) e tecido conjuntivo intramuscular (Kjaer, 2004; Kannus, 1988). No entanto, existe uma carência de trabalhos que avaliem as alterações morfológicas do tecido muscular e conjuntivo após imobilização e alongamento passivo manual de curta duração (30 s a 1 min), comumente usado para reabilitação e ganho de flexibilidade.

Portanto, frente à carência de estudos científicas que avaliassem o efeito do alongamento passivo de curta duração em músculos saudáveis e encurtados pós-imobilização, este estudo se propôs avaliar o efeito do alongamento muscular passivo intermitente usando 10 ciclos de alongamento passivo com 60 s de duração, intercalados com 30 s de relaxamento aplicados diariamente ou três vezes por semana ao longo de três semanas, em músculos sóleos normais e encurtados.

2- OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do alongamento passivo manual intermitente nas fibras musculares e tecidos conjuntivo intramuscular, do sóleo previamente imobilizado, de ratos.

3- APRESENTAÇÃO

Esta pesquisa é fruto de 5 anos de trabalho, sendo 2 anos dedicados ao mestrado e 3 anos ao doutorado. No mestrado fomos levados a investigar o efeito do alongamento passivo de longa duração (40 min) 3 vezes por semana em músculo esquelético imobilizado de ratos, uma vez que, na literatura não encontrávamos estudos que tivesse avaliado uma frequência de alongamento mais próxima à usada na reabilitação. Ao final deste estudo tivemos resultados relevantes dando origem a três artigos já publicados e apresentados em anexos (Mestrado e Doutorado). No doutorado resolvemos continuar a investigação agora avaliando o efeito de dois protocolos de alongamento passivo manual de curta duração no tecido muscular e conjuntivo de músculos encurtados e normais de ratos, considerando frequência e tempo de alongamento comumente usado na reabilitação e na atividade esportiva para ganho de flexibilidade. Desta forma, tentando preencher algumas lacunas da literatura, respondendo como o músculo esquelético responde a curtos períodos de alongamento passivo. Este novo estudo deu origem a 3 artigos os quais também apresentaram relevantes resultados. Assim para apresentação desta tese, os resultados obtidos foram organizados em capítulos que correspondem aos 3 manuscritos gerados durante o seu desenvolvimento, os quais passaremos a apresentar.

4- MANUSCRITO 1

Artigo submetido ao Connective Tissue Research

Curtas Sessões de Alongamento Passivo após Imobilização no Músculo Sóleo de Ratos Aumentam a Organização Macromolecular do Colágeno e Área das Fibras Musculares.

Eliane Lima Coutinho¹, Camila De Luca¹, Benedito Campos Vidal², Tania Fatima Salvini¹

¹Unidade de Plasticidade Músculo Esquelética, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, São Carlos, SP, Brasil.

²Instituto de Biologia, Departamento e Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Tania F. Salvini. Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos. CEP 13565-905 - São Carlos, SP. Brasil. Telefone: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. E-mail: tania@power.ufscar.br

Palavras Chaves: Alongamento, Tecido Conjuntivo, Atrofia Muscular, Hipertrofia, Reabilitação.

Título Corrido: Curtos Alongamentos no Músculo Esquelético.

Tipo de Artigo: Pesquisa Original

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito de curtas sessões de alongamento no músculo sóleo após imobilização, através da birrefringência do tecido conjuntivo intramuscular (TCI) e da área da fibra muscular. Trinta ratos foram divididos em cinco grupos: 1) sóleo esquerdo foi imobilizado em posição de encurtamento; 2) após imobilização os animais permaneceram livres; 3) após imobilização o sóleo foi alongado diariamente; 4) após imobilização o sóleo foi alongado 3 vezes por semana; 5) controle. A imobilização causou perda da birrefringência do TCI e da área da fibra muscular, enquanto apenas o alongamento diário aumentou ambos comparados com o controle ($P < 0.05$). Em conclusão, curtos alongamentos diários após imobilização induziram a reorganização macromolecular dos feixes de colágeno e hipertrofia das fibras musculares no sóleo de ratos.

INTRODUÇÃO

Embora, o efeito do alongamento em músculo esquelético tenha sido amplamente investigado, a influência mecânica do alongamento passivo de curta duração, comumente usado na reabilitação, para recuperação do trofismo e da organização do tecido conjuntivo do músculo esquelético pós-imobilização, não têm sido estudado em detalhes. Por outro lado, as conseqüências deletérias da imobilização, tais como perda de sarcômeros em série (1-5), proliferação do tecido conjuntivo e diminuição da área de secção transversa das fibras musculares (1,12) têm sido amplamente estudadas, visto que, a imobilização é freqüentemente usada no tratamento de diversos tipos de afecções do sistema músculo esquelético (6-9).

Após a imobilização com o músculo em posição de encurtamento, a atrofia muscular e a proliferação do tecido conjuntivo são consideradas as adaptações musculares mais importantes e ambas as alterações são causadas por um desequilíbrio entre síntese e degradação das proteínas musculares e colagenosas (10). Estudos prévios mostram que a remodelação normal do colágeno é de apenas de 1,3 % ao dia em músculo de ratos, enquanto que a taxa de síntese das proteínas musculares é 11,8%. Desta forma, durante a imobilização ocorre maior perda de proteínas musculares com aumento proporcional na taxa de tecido conjuntivo intramuscular (TCI) desorganizado, diminuindo a flexibilidade do tecido muscular e a área de secção transversa (AST) das fibras musculares (11,12), acarretando em menor capacidade funcional.

O alongamento no músculo esquelético é conhecido como um potente estímulo para amenizar atrofia e induzir a hipertrofia muscular (4,5,13,14). Um estudo recente mostrou que sessões de alongamento aplicada no músculo sóleo do rato 3 vezes por semana, por 40

min aumentaram o número de sarcômeros em série e área de secção transversa das fibras musculares (4). Também foi identificado o efeito benéfico do alongamento muscular na remodelação e na organização das fibras de colágeno do TCI (1,14).

Embora prévios estudos demonstrem que a organização macromolecular das fibras de colágeno no músculo, tendão, osso e cartilagem podem ser avaliada através das medidas de birrefringência, por meio da microscopia de luz polarizada (15-20), poucos trabalhos têm investigado a organização macromolecular do TCI após períodos de imobilização, usando a análise da birrefringência (20,21), a qual é considerada uma acurada técnica de avaliação morfológica. Assim, as medidas de birrefringência são fundamentais para investigar as alterações na orientação macromolecular das fibras de colágeno durante o desenvolvimento, o reparo, o envelhecimento e a adaptação após exercício (22).

A avaliação da organização dos feixes de colágeno é feita através das medidas de birrefringência total a qual é a soma da birrefringência de forma ou textural e birrefringência intrínseca (23,24). A birrefringência de forma é dependente da geometria das moléculas, dos volumes parciais (concentração), estado de agregação e orientação dos feixes de colágenos, enquanto que, a birrefringência intrínseca é determinada pela orientação de todas as transições de elétrons das moléculas (23,24). Assim, esse método é uma importante ferramenta para determinar a direção das vibrações e conseqüentemente orientação molecular das fibras de colágeno do TCI (20,22,25), informando as alterações macromoleculares do tecido conjuntivo intramuscular, associadas à imobilização e alongamento muscular.

Embora os estudos reportados aqui apresentem importante contribuição sobre o alongamento no trofismo do músculo esquelético e organização do tecido conjuntivo,

muitos deles usaram longos períodos de alongamento muscular, o que não é normalmente usado durante reabilitação ou atividades esportivas. Também é difícil para humanos manter longos períodos de alongamento muscular. Por outro lado, curtos alongamentos musculares (30 Seg ou 1 min) têm sido recomendados para tratar músculos humanos encurtados devido à efetividade no ganho da amplitude de movimento e flexibilidade (26,27). Embora sessões de alongamentos por curtos períodos sejam recomendadas, efetivamente e sem riscos para humanos, os efeitos deste procedimento no músculo esquelético de humanos não têm sido avaliados em detalhes, podendo tais procedimentos ser realizados e estudado em detalhes em modelo animal.

Embora, vários estudos já mostraram a influência da imobilização e do alongamento muscular de longa duração no tecido conjuntivo intramuscular e na área de seção transversa (1,3,28,29), este é o primeiro estudo usando análise de microscopia de luz polarizada e morfologia que avaliou o efeito do alongamento passivo de curta duração, utilizando protocolo de alongamento similar ao usado na reabilitação, através da análise da organização macromolecular das fibras de colágeno do tecido conjuntivo e da área de seção transversa de músculos previamente imobilizados.

Nossa hipótese neste estudo foi que curtas sessões de alongamento muscular são efetivos para recuperação morfológica das fibras musculares e do tecido conjuntivo após imobilização. Para isto foi analisado o efeito do alongamento passivo aplicado diariamente e três vezes por semana no músculo sóleo após imobilização.

Algumas restrições éticas dificultam o estudo da adaptação do músculo e tecido conjuntivo de humanos submetido ao alongamento. Assim, embora este estudo tenha usado modelo animal, ele trás novas informações sobre a influência do alongamento passivo manual de

curta duração na organização do tecido conjuntivo e no trofismo das fibras de músculos esqueléticos, previamente imobilizados.

MATERIAIS E METODOS

Animais e grupos experimentais

Foram usados 30 ratos machos Wistar com 18 semanas de idade (356 ± 11 g). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em condições ambientais controladas e tiveram livre acesso à água e alimentação. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xylazina (12 mg/kg) e ketamina (95 mg/kg) para aplicação da imobilização, quando submetidos ao alongamento e durante cirurgia para remoção dos músculos. Após o experimento os animais foram eutanaziados com overdose de anestésico. O estudo foi aprovado pelo Comitê Ético para Animais e Experimentos da Universidade, que foi desenvolvido do acordo com a declaração de Helsinki.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 6 animais cada: a) *Imobilizado (I)*: O músculo sóleo esquerdo foi imobilizado por 4 semanas na posição encurtada mantida pela máxima flexão plantar do tornozelo, como descrito previamente (4.5), e o músculo foi avaliado imediatamente após o período do imobilização; b) *Três semanas livre após a imobilização (I+3SLivre)*: Após a imobilização os animais ficaram livres nas gaiolas por 3 semanas e não foi submetido ao alongamento; c) *Alongamento 3 vezes por semana após a imobilização (I+A13)*: após as 4 semanas do imobilização, o músculo sóleo foi alongado 3 vezes por (segundas-feiras, quartas-feiras e sexta-feira) por 3 semanas e avaliado após a última sessão de alongamento; d) *Alongamento diário após imobilização (I+A1Diário)*: após o período do imobilização, o músculo do sóleo foi alongado passivamente diariamente durante as 3 semanas (10 sessões de 60s de alongamento com 30s de repouso entre cada alongamento) e avaliado após a última sessão

de alongamento; e) *controle (c)*: um grupo de animais não foi submetido a nenhum dos procedimentos e o sóleo foi avaliado após 7 semanas.

Procedimento de Imobilização

Para manter o músculo sóleo em máxima posição de encurtamento o tornozelo esquerdo foi mantido em máxima flexão plantar, como descrito previamente (4.5). O dispositivo de imobilização usado é eficaz para produzir o desuso crônico e atrofia do músculo sóleo (4.5).

Procedimento de alongamento

Para alongar os músculos sóleos esquerdos, o tornozelo esquerdo foi mantido em máxima flexão dorsal durante 1 minuto, executado manualmente, como proposto por Ikeda et al. (30). Uma sessão de alongamento passivo consistiu em 10 curtos alongamentos, mantido por 1 minuto, com 30 segundos de intervalos de descanso entre cada alongamento. As sessões de alongamento passivo executados manualmente foram escolhidas para este estudo porque um procedimento similar é eficaz para melhorar a flexibilidade nos seres humanos (31.32).

Morfologia Muscular

Após sete semanas do início do experimento todos os animais foram anestesiados e pesados e os músculos sóleos direito e esquerdo foram cuidadosamente dissecados.

Para histologia o músculo foi imediatamente congelado em isopentano, resfriado em nitrogênio líquido, e estocado em freezer a -80°C (Forma Scientific Inc., Marietta, Oh,USA). Os cortes transversos foram obtidos do ventre muscular usando criostato (icrom HE 505, Germany) e os cortes histológicos foram corados com Azul de Toluidina/1% borax

para a avaliação morfológica das medidas das áreas das fibras musculares, como descrita previamente (33).

Para as medidas de birrefringência foram usadas cortes transversais das fibras musculares sem coloração e embebidas em água destilada. Como previamente descrito (34), após 4 semanas de imobilização, o músculo é afetado pelo encurtamento das fibras musculares e as fibras de colágeno se adaptam pelo arranjo fibrilar no endomísio e perimísio tornando-se mais circunferencial, perdendo assim sua disposição longitudinal. Devido a estas mudanças no arranjo de fibras do colágeno, a birrefringência do tecido conjuntivo poder ser melhor visualizada por meio de cortes transversais das fibras do músculo.

Microscopia de Polarização: Retardo Óptico da birrefringência do TCI

A análise da birrefringência total do tecido conjuntivo é uma técnica de alta reprodutibilidade para detectar a variação no estado de agregação molecular dos feixes de colágenos (22). A birrefringência do tecido conjuntivo do músculo sóleo (endomísio e perimísio) foi medida através do retardo óptico que representa o estado de agregação molecular do colágeno. Essa análise foi realizada através da microscopia de luz polarizada.

As medidas dos retardos ópticos (RO) foram feitas num microscópio de luz polarizada Zeiss equipado com uma objetiva 10x, luz monocromática (546 nm) e compensador Sénarmont $1 / 4 \lambda$. Para análise dos músculos sóleos foram feitos corte de $10\mu\text{m}$ os quais foram embebidos em água ($n_D=1.333$) por 30 minutos em água destilada (36). Após o período de imersão, as lâminas foram cobertas por lamínulas, contendo água destilada nas interfaces.

Foram realizadas 100 medidas de RO em diferentes pontos de cada secção do músculo sóleo (endomísio e perimísio) considerando o meio de embebição, assim permitindo a heterogeneidade da distribuição dos feixes de colágeno em de cada músculo. Sabe-se que 45°, com relação ao plano de luz polarizada (PPL), as fibras de colágeno mostram maior brilho de birrefringência e conseqüentemente um maior valor do RO. Isto ocorre porque a maioria das fibras do colágeno é guiada ao longo do eixo longitudinal das fibras musculares. Assim, as medidas do RO foram realizadas com as fibras de colágeno orientadas a 45° (figura 1).

Áreas de Secção-transversa das Fibras Musculares (ASC)

As áreas de secções transversas, de 100 fibras musculares foram medidas usando um microscópio de luz Axiolab (Carl Zeiss, Germany) e um software para morfologia (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss). As fibras musculares foram escolhidas aleatoriamente da região central de cada secção transversa de cada músculo sóleo corado com Azul de Toluidina.

Análise estatística

O teste Student *t*-test pareado foi usado para comparar os dados do sóleo direito e esquerdo dos mesmos animais de cada grupo. As possíveis diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste ANOVA e Tukey, com o nível de significância de 5% ($P < 0.05$).

RESULTADOS

Peso Muscular

A tabela 1 mostra as alterações no peso do músculo sóleo após 4 semanas de imobilização e o efeito das sessões do alongamento. O peso do músculo diminuiu após a imobilização. Contrariamente, o peso do músculo do sóleo aumentou após sessões diárias de alongamento passivo. Entretanto, três sessões de alongamento por semana não forneceram ganho adicional ao peso do músculo, comparado ao grupo mantido livre na gaiola após a imobilização (Tabela 1).

Áreas de secção transversa das fibras musculares

Os músculos sóleos imobilizados em posição de encurtamento por 4 semanas diminuiram ($37\pm 10\%$) da área de secção transversa comparado com os sóleos contralaterais (1179 ± 416 vs $2084 \pm 728 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $P<0,05$) e com o grupo controle ($3778 \pm 1007 \mu\text{m}^2$ vs $2084 \pm 728849 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $P<0,01$) (Figura 2). O músculo sóleo imobilizado e alongado diariamente apresentou ganho significativo ($10+4,1\%$) quando comparados com o sóleo contralateral ($2567 \pm 814 \mu\text{m}^2$ vs $2333 \pm 849 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $P<0,05$) e com os demais grupos ($P<0,01$, Figura 2).

Os músculos sóleos imobilizados e alongados três vezes assim como, os imobilizados e livres recuperaram as áreas de secções transversas quando comparados com os sóleos contralaterais direito ($2349 \pm 1089 \mu\text{m}^2$ vs $2353 \pm 948 \mu\text{m}^2$ e $2151 \pm 599 \mu\text{m}^2$ vs $2169 \pm 565 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $P<0,05$), embora eles tenham apresentado menor área comparado com os músculos controle ($P<0,05$; Figura 2). Nenhuma diferença foi encontrada na área de secção transversa das fibras musculares dos sóleos direitos e

esquerdos do grupo controle ($P > 0,05$). O grupo imobilizado e alongado diariamente apresentou um aumento de $10 \pm 4,1\%$ na ASC das fibras comparado com as contra laterais ($P < 0,01$).

Retardo Óptico da birrefringência (ROs)

As medidas de birrefringência do tecido conjuntivo do músculo do sóleo após a imobilização exibiram baixo valor de RO (Tabela 2). Os músculos soleus dos grupos I+3SLivre e I+A13 recuperaram os valores de ROs comparado com os soleus contralaterais e o grupo controle. Por outro lado, o músculo sóleo alongado diariamente aumentou os valores de ROs comparado com o contralateral e o grupo controle ($P < 0,01$) (tabela 2).

Os valores médios dos ORs da birrefringência de fibras de colágeno apresentaram alta correlação com os valores médios da área de seção transversa das fibras musculares, ambos tratados com alongamento passivo ($p < 0,05$, $r = 0,99$; Figura 3).

A figura 4 mostra o efeito da imobilização e do alongamento passivo na birrefringência (brilho) das fibras de colágeno do TCI. O grupo de controle apresenta intensa birrefringência no perimísio e endomísio (4A). No entanto, a imobilização causou uma forte redução da birrefringência das fibras de colágeno (4B). Contrariamente, o alongamento aplicado diariamente causou forte aumento da birrefringência e espessamento dos feixes de colágeno no perimísio (4C). O grupo Imobilizado e mantido livre na gaiola assim como o imobilizado e alongado 3 vezes por semana não foram diferentes do controle.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que as sessões diárias de alongamento passivo foram eficazes para induzir a hipertrofia das fibras musculares e a reorganização macromolecular dos feixes de colágeno do tecido conjuntivo intramuscular no músculo sóleo, imobilizado previamente em posição encurtada. Entretanto, este benefício não foi observado quando as sessões de alongamento foram aplicadas 3 vezes por semana. Para nosso conhecimento este é o primeiro estudo que avaliou o efeito das sessões de alongamento passivo, similares ao usado na reabilitação humana, no tecido conjuntivo muscular de rato.

Retardo Óptico da Birrefringência do Tecido Conjuntivo Intramuscular

No presente estudo quatro semanas de imobilização causou uma significativa diminuição na birrefringência das fibras de colágeno. Prévios estudos demonstraram que a perda de birrefringência ocorre devido à desorganização das fibras de colágeno após imobilização (20). A redução da birrefringência ocorre devido à redução do estado de agregação dos feixes de colágeno que causam a perda das características cristalinas e da orientação das moléculas do colágeno (23). Assim, nossos resultados indicam que a imobilização diminuiu o estado de agregação dos feixes do colágeno no músculo esquelético do rato imobilizado na posição de encurtamento.

Foi interessante também observar que a atividade livre do animal durante 3 semanas após-imobilização estimulou a reorganização macromolecular das fibras do colágeno. De acordo com Vilarta e a Vidal (22) durante a marcha do animal, os feixes de colágeno são

submetidos às forças de tensão suficiente para estimularem mecanicamente a reorganização do colágeno.

Foi intrigante verificar que a birrefringência dos músculos sóleos submetidos às sessões de alongamento, 3 vezes por semana, após a imobilização não forneceu um benefício adicional, comparada aos animais que permaneceram livres durante este período. Por outro lado, as sessões diárias de alongamento aumentaram a reorganização macromolecular das fibras do colágeno comparada a todos os outros grupos. Estes resultados demonstram que a remodelação e o arranjo do colágeno do tecido conjuntivo dos músculos atrofiados dependem da frequência de estimulação. Estas conclusões são baseadas nos valores do retardo óptico da birrefringência total (Forma + intrínseca) das fibras do colágeno do endomísio e do perimísio dos músculos sóleos.

Um estudo de Vilarta e de Vidal (22) mostrou que o aumento da birrefringência das fibras do colágeno é devido ao aumento da birrefringência de forma, indicando que o processo de adaptação das fibras do colágeno ao alongamento muscular é o resultado da reorganização da matriz extracelular (ME). De acordo com Oakes et al. (36), Michna (37), isto corresponde aos feixes de colágeno com fibrilas mais alinhadas e com as condições de empacotamento molecular mais intensa. Assim, os resultados deste estudo indicam que a causa do aumento da birrefringência total das fibras do colágeno do TCI após alongamento diário pode ser devido ao aumento da birrefringência de forma, em consequência a uma maior reorganização macromolecular das fibras de colágeno.

Morfologia

Através da análise morfológica feita em microscópio de luz polarizada é possível observar variações na intensidade do brilho da birrefringência do TCI, provavelmente devido ao

aumento da tensão nas fibras do colágeno causado pelo alongamento diário. Esta possibilidade está de acordo com os fenômenos biofísicos das fibras de colágeno, quando submetidas às tensões mecânicas, observadas em estudos prévios (36,37). Assim, os resultados deste estudo sugerem que o mecanismo controle do estado de agregação das fibras do colágeno do músculo esquelético pode ser influenciado pela frequência mecânica da estimulação durante o alongamento passivo. A contribuição deste estudo é a apresentação de novas informações na adaptação do músculo esquelético quando submetido à imobilização e ao alongamento passivo, usando a análise de birrefringência que é uma metodologia acurada, a qual vem adicionar-se aos métodos já existentes de avaliação da organização e da quantificação do TCI descrito nos estudos prévios (3,7,20,38-40).

Áreas de Secção-transversa das Fibras Musculares

Um interessante achado neste estudo é que o alongamento passivo manual 3 vezes por semana, usado freqüentemente na reabilitação para o ganho de flexibilidade após-imobilização (26,31,41,42) não produziu o ganho adicional comparado à atividade livre na gaiola. Por outro lado, o alongamento passivo aplicado diariamente aumentou a área de seção transversal em aproximadamente 10% com relação ao soleus contra lateral. Estes resultados mostram que a área das fibras do músculo foi dependente da frequência, ou seja, 10 minutos de alongamento passivo realizado diariamente foram mais eficazes para gerar hipertrofia na fibra do músculo, enquanto 3 vezes causaram nenhum efeito hipertrófico, no entanto, não foi significativo .

Este efeito hipertrófico do alongamento foi encontrado também em outros estudos (43,44,45) que mostraram o aumento a massa muscular e área de secção transversa das fibras musculares após alongamento passivo. Entretanto, nenhum destes estudos usou

protocolo de sessões de alongamento passivo, considerando os parâmetros de duração e frequência frequentemente usados na reabilitação (27,41,48). De acordo com Glass (48) esta hipertrofia ocorre em consequência a adição de filamentos contráteis no miofilamento, aumentando o AST e também a proporção de força no músculo.

Após quatro semanas de imobilização, os músculos sóleos apresentaram uma redução de 37% das áreas de secções transversas de suas fibras, Esta resposta atrófica do músculo esquelético ao desuso é bem descrito em um grande número de estudos em humanos e animais (1,3,48,49-54).

Por outro lado, a recuperação da AST encontrada nas fibras dos músculos imobilizados e livres por três semanas foi provavelmente devido ao estímulo de tensão desencadeada pela descarga de peso sobre o músculo sóleo durante a atividade na gaiola, estimulando assim, a síntese de proteínas, conforme já descrito em outros estudos (3,52,55).

A metodologia usada neste estudo não permite identificar os mecanismos associados relacionados ao aumento da AST das fibras musculares no grupo alongado diariamente. Entretanto, considera-se que os sensores mecânicos que ligam a matriz extracelular ao citoesqueleto (56,57) possam funcionar como transdutores do sinal mecânico do alongamento, regulando a expressão gênica das células muscular as quais podem ser ativadas pela frequência da estimulação (58). Provavelmente o alongamento diário foi mais eficiente na ativação dos sensores mecânicos envolvidos no processo de hipertrofia do que estímulos aplicados em menor frequência.

Já está descrito na literatura que a via da PI3K/AKT (phosphatidylinositol3-kinase-AKT uma serina-teonina kinase) envolvida na regulação da hipertrofia é ativada pelo alongamento (48). No entanto, ainda não se sabe qual o estímulo necessário para ativar essa via. Um estudo interessante realizado por Ikeda et al. (2003), em músculos sóleos de ratos,

mostrou que o alongamento passivo durante 4 horas foi mais eficaz que 2 horas para estimular a expressão da miogenina, considerada um fator miogênico de transcrição na hipertrofia. Os autores concluíram que uma duração maior de alongamento passivo é necessária para ativar esses fatores miogênicos. Eles concluem que se estudos como esse puderem ser aplicados em situações clínicas, o alongamento passivo poderá ser usado para preservar ou aumentar a força muscular. Outro estudo recente (46) mostrou que sessão de 30 minutos de alongamento diário aumentou a expressão da Myo-D (gene envolvido no processo de hipertrofia) no músculo sóleo de ratos. Baseado nestes resultados, que mostraram que longos períodos de alongamentos passivos estimulam a expressão de genes envolvidos na hipertrofia, nós podemos sugerir que as sessões de curtos alongamentos aplicados diariamente no presente estudo pode ter estimulado os mecanismos associados à hipertrofia muscular. Futuros estudos serão necessários para avaliar esta hipótese.

Em conclusão, os resultados deste estudo mostraram que sessões de alongamento passivo aumentaram a AST das fibras musculares e a reorganização macromolecular dos feixes de colágeno do TCI no músculo sóleo de ratos, previamente imobilizados em posição de encurtamento. Apesar dos resultados serem em músculos esqueléticos de ratos, eles indicam uma importante adaptação associada a protocolos de curtos alongamentos passivos no músculo esquelético.

Agradecimentos

Esta pesquisa teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brasil. As alunas de doutorado e iniciação científica tiveram suas bolsas de estudos financiadas pela CAPES e FAPESP, respectivamente (Agências

Brasileiras). Os autores agradecem ao Dr. Jorge Oishi pela ajuda na análise estatística e a Tereza F. Piassi pela assistência técnica.

REFERENCIAS

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

2- Goldspink DF. (1977). The influence of denervation and stretch on the size and protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol.* 269(1):87-88.

3- Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TL, Kvist M, Vieno T, Jarvinen TA, Natri A, Jarvinen M. (1998). Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol.* 84(4):1418-24.

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

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

6- Booth FW. (1978). Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization. *J Appl Physiol.* 44(2): 225-30.

7- Jozsa L, Kannus P, Thoring J, Reffy A, Jarvinen M, Kvist M. (1990). The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br.* 72(2):293-7.

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

- 9- Kannus P, Parkkari J, Jarvinen TL, Jarvinen TA, Jarvinen M. (2003). Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. *Scand J Med Sci Sports*. 13(3):150-4.
- 10- Karpakka J, Vaananen K, Orava S, Takala TE. (1990). The effects of preimobilização training and imobilização on colágeno synthesis in rat skeletal muscle. *Int J Sports Med*. 11(6):484-8.
- 11- Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Takala TE. (2001). Regulation of synthesis of fibrillar colágenos in rat skeletal muscle during imobilização in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 172(2):131-40.
- 12- Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TE. (2003). Synthesis and degradation of type IV colágeno in rat skeletal muscle during imobilização in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 177(4):473-81.
- 13- Antonio J, Gonyea WJ. (1993). Progressive stretch overload of skeletal muscle results in hypertrophy before hyperplasia. *J Appl Physiol*. 75(3):1263-71.
- 14- Goldspink G, Williams P, Simpson H. (2002). Gene expression in response to muscle stretch. *Clin rthop Relat Res*. (403 Suppl): S146-52.
- 15- Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. (1998). Human wound contraction: colágeno organization, fibroblasts, and myofibroblasts. *Plast Reconstr Surg*. 102(1): 124-31.
- 16- Vidal BC. (2003). Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized lightmicroscopy. *Micron*. 34(8):423-32.
- 17- Pierce MC, Sheridan RL, Hyle Park B, Cense B, de Boer JF. (2004). Colágeno denaturation can be quantified in burned human skin using polarization-sensitive optical coherence tomography. *Burns*. 30(6):511-7.

18- Vidal BC, Mello ML. (2005). Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye Ponceau SS to colágeno fibers. *Biopolymers*. 78(3):121-8.

19- Traini T, Degidi M, Strocchi R, Caputi S, Piattelli A. (2005). Colágeno fiber orientation near dental implants in human bone: Do their organization reflect differences in loading? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 74(1):538-46.

20- Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Jarvinen M. (2002). Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil*. 23(3):245-54.

21- Diamont J, Keller A, Baer E, Litt M and Arridge RGC. (1972). Colágeno, ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc R. Soc. Lond. B*. 180:293-315.

22- Vilarta R, Vidal BC. (1989). Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in colágeno bundles. *Matrix*. 9(1):55-61.

23- Vidal BC. (1980). The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of colágeno bundles. *Cellular & Molecular Biology*. 26:415-421.

24 - Vidal BC. (1986). Evaluation oh the carbohydrate role in the molecular order of colágeno bundles. Microphotometric measurements of textural birrefringência. *Cell Mol. Bio*. 32:527-535.

- 25 - Vishniakov GN, Levin GG. (2002). Optic methods for measurements of muscle fiber birrefringência. *Biofizika*. 47(4):711-5.
- 26- Bandy WD and Irion JM. (1994). The effects of time on static stretch on the flexibility of the hamstring muscle. *Phys Ther*. 74(9):845-852.
- 27- Bandy WD, Irion JM, Briggler M. (1997). The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. *Phys Ther*.77(10):1090-1096.
- 28- Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TE. (2003). Synthesis and degradation of type IV colágeno in rat skeletal muscle during imobilização in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 177(4):473-81.
- 29- Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, Majors AK, Scalise D, Delp MD. (2001). Hindlimb unloading induces a colágeno isoform shift in the soleus muscle of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 281(5):R1710-7.
- 30- Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Horinouchi K, Tanaka N. (2004). Induction of myogenin messenger ribonucleic acid in rat skeletal muscle after 1 hour of passive. Repetitive stretching. *Arch Phys Med Rehabil*. 85(1):166-7.
- 31- Worrell TW, Smith TL, Winegardner J. (1994). Effect of hamstring stretching on hamstring muscle performance. *J Orthop Sports Phys Ther*. 20(3):154-9.
- 32- Davis DS, Ashby PE, McCale KL, McQuain JA, Wine JM. The effectiveness of 3 stretching techniques on hamstring flexibility using consistent stretching parameters. *J Strength Cond Res*. 2005;19(1):27-32.
- 33- Salvini TF, Belluzzo SS, Selistre de Araújo HS, Souza DH. (2001). Regeneration and changes of muscle fiber types injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom. *Toxicon*. 39(5): 641-649.

- 34- Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Motomura M, Eguchi K. (2004). Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, colágeno fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. *J Muscle Res Cell Motil.*;25(2):159-66.
- 35- Vidal BC, Mello ML, Godo C, Caseiro AC, Abujadi JM. (1975). Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated colágeno bundles: ADB and form birrefringência curves. *Ann Histochem.* 20(1):15-26.
- 36- Oakes, BW, Paker AW, Normal J. (1982). Changes in colágeno fiber population in young rat cruciate ligaments in response to a one month intensive exercise program. *Connect Tissue Res.* 9:212.
- 37- Michna H. (1984). Morphometric analysis of loading-induced changes in colágeno-fibril populations in young tendons. *Cell Tissue Res.* 236(2):465-70.
- 38- Galeski A, Kastelic J, Baer E, Kohn RR. (1977). Mechanical and structural changes in rat tail tendon induced by alloxan diabetes and aging. *J Biomech.* 10(11/12):775-82.
- 39- Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. (1972). Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to imobilização at different lengths by plaster casts. *J Physiol.* 224(1):231-44.
- 40- Vidal, BC. (1986). Evaluation on the carbohydrate role in the molecular order of colágeno bundles. Microphotometric measurements of textural birrefringência. *Cell. Mol. Biol.* 32:527-535.
- 41- Willy RW, Kyle BA, Moore SA, Chleboun GS. (2001). Effect of cessation and resumption of static hamstring muscle stretching on joint range of motion. *J Orthop Sports Phys Ther.* 31(3):138-44.

- 42- Halbertsma JP, van Bolhuis AI, Goeken LN. (1996). Sport stretching: effect on passive muscle stiffness of short hamstrings. *Arch Phys Med Rehabil.* 77(7):688-92.
- 43- Antonio J, Gonyea WJ. (1993). Role of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia in intermittently stretched avian muscle. *J Appl Physiol.* 74(4):1893-8.
- 44- Alway SE, Gonyea WJ, Davis ME. (1990). Muscle fiber formation and fiber hypertrophy during the onset of stretch-overload. *Am J Physiol.* 259(1 Pt 1):C92-102.
- 45- Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Tanaka N. (2003). Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 84(3):419-23.
- 46- Gomes ARS, Soares AG, Peviani SM, Nascimento RB, Moriscot AS, Salvini TF. (2006). The effect of 30 minutes of passive stretch of rat soleus on the myogenic differentiation myostatin and atrogen-1 Gene expressions. *Arch Phys Med Rehabil* 87:141-146.
- 47- Willy RW, Kyle BA, Moore SA, Chleboun GS. (2001). Effect of cessation and resumption of static hamstring muscle stretching on joint range of motion. *J Orthop Sports Phys Ther.* 31(3):138-44.
- 48- Glass DJ. (2003). Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol.* 5(2):87-90.
- 49- Goldspink DF, Garlick PJ, McNurlan MA. (1983). Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscles undergoing compensatory growth and subsequent denervation atrophy. *Biochem J.* 15;210(1): 89-98.
- 50- Ansved T. (1995). Effects of imobilização on the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand.* 154(3): 291-302.

51- Shaffer MA, Okereke E, Esterhai JL Jr, Elliott MA, Walker GA, Yim SH, Vandeborne K. (2000). Effects of imobilização on plantar-flexion torque, fatigue resistance, And functional ability following an ankle fracture. *PhysTher.* 80(8):769-80.

52- Seki K, Taniguchi Y, Narusawa M. (2001). Effects of joint imobilização on firing rate modulation of human motor units. *J Physiol.* 1;530(Pt 3):507-19.

53- Jagoe RT, Goldberg AL. (2001). What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 4(3):183-90.

54- Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J.* 18(9):1025-1027.

55- Zemková H, Teisinger J, Almon RR, Vejsada R, Hník P & Vyskocil F. (1990). Imobilização atrophy and membrane properties in rat skeletal. *Pflügers Arch Europ J Physiol.* 16:126-129.

56- Hynes RO. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69(1):11-25.

57- Ruwhof C, van der Laarse A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res.* 47(1):23-37.

58- Ross RS, Pham C, Shai SY, Goldhaber JI, Fenczik C, Glembotski CC, Ginsberg MH, Loftus JC. (1998). Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 82(11):1160-72

Tabela 1: Efeito de sessões de alongamento no peso dos músculos sóleos.

	Sóleo esquerdo (g) Imobilizado e alongado	Sóleo direito (g) Contralateral	Diferença Relativa (%)
I	0,13±0,04*	0,19 ± 0,03	-44 ±6,1 ▼
I+3SLivre	0,17±0,02	0,19±0,01	-10±2,2
I+3Al	0,18±0,02	0,17±0,01	6±1,7
I+AlDiário	0,21±0,02*	0,18±0,03	13,1±2,8 ▼
C	0,24±0,02	0,24±0,02	1,7±1,3 ▼

Os resultados são média ± desvio padrão.

I: músculos sóleo imobilizados em posição de encurtamento por 4 semanas; I+3SLivre: após imobilização, o animal permaneceu livre por 3 semanas; I+Al3: após imobilização o músculo sóleo foi alongado 3 vezes por semana durante 3 semanas; I+AlDiário: após imobilização o músculo sóleo foi alongados diariamente por 3 vezes; C: os animais não foram submetidos aos procedimentos de imobilização e alongamento. *P<0,01 quando comparado com o sóleo contralateral, ▼ P < 0.01 quando comparado com a diferença relativa de todos os grupos.

Tabela 2: Efeito de sessões de alongamento no retardo óptico da birrefringência do tecido conjuntivo intramuscular.

	Sóleo esquerdo (nm)	Sóleo direito (nm)	Diferença Relativa (%)
	Imobilizado e alongado	Contralateral	
I	11.9±3.7 *	16.1±4.5	25.7±1.7 ♦
I+3SLivre	10.7±2,1	10.5±2.5	1,8±0,8
I+3Al	11.2±2,1	11.4±1,8	1.9±0,7
I+AlDiário	12.4±2.2 *	10.1±2.4	13.8±5.4 ♦
C	12.6±2,4	12.4±2,6	2.7±0.9 ♦

Os resultados são média ± desvio padrão.

I: músculos sóleo imobilizados em posição de encurtamento por 4 semanas; I+3SLivre: após imobilização, o animal permaneceu livre por 3 semanas; I+Al3: após imobilização o músculo sóleo foi alongado 3 vezes por semana durante 3 semanas; I+AlDiário: após imobilização o músculo sóleo foi alongados diariamente por 3 vezes; C: os animais não foram submetidos aos procedimentos de imobilização e alongamento. *P<0,01 quando comparado com o sóleo contralateral, ♦ P < 0.01 quando comparado com a diferença relativa de todos os grupos.

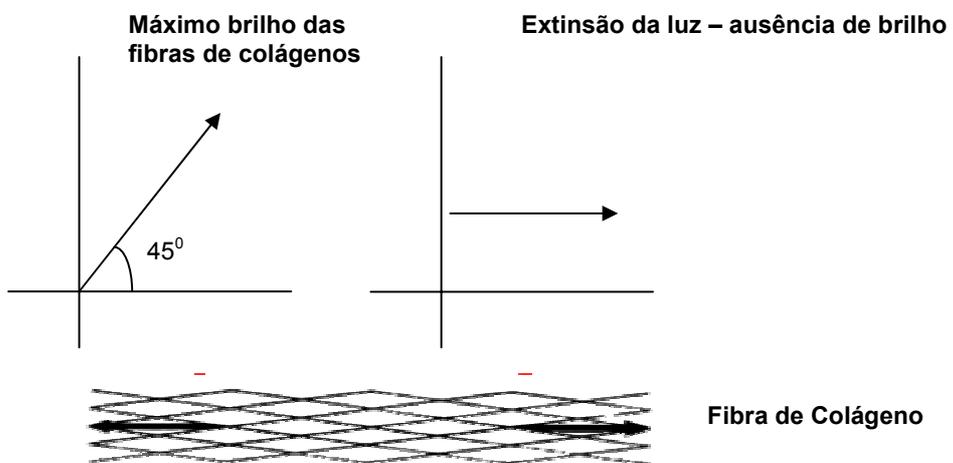


Figura 1

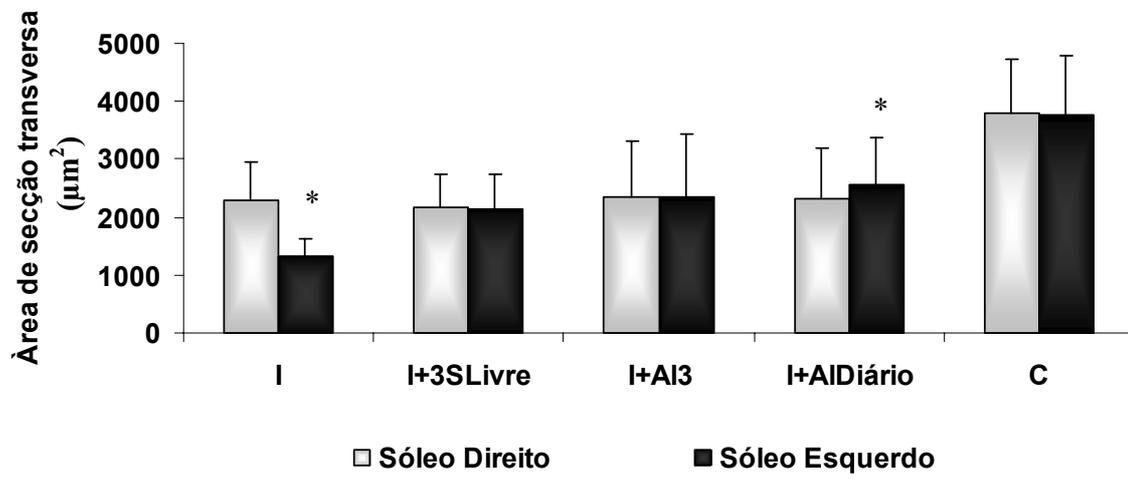


Figura 2

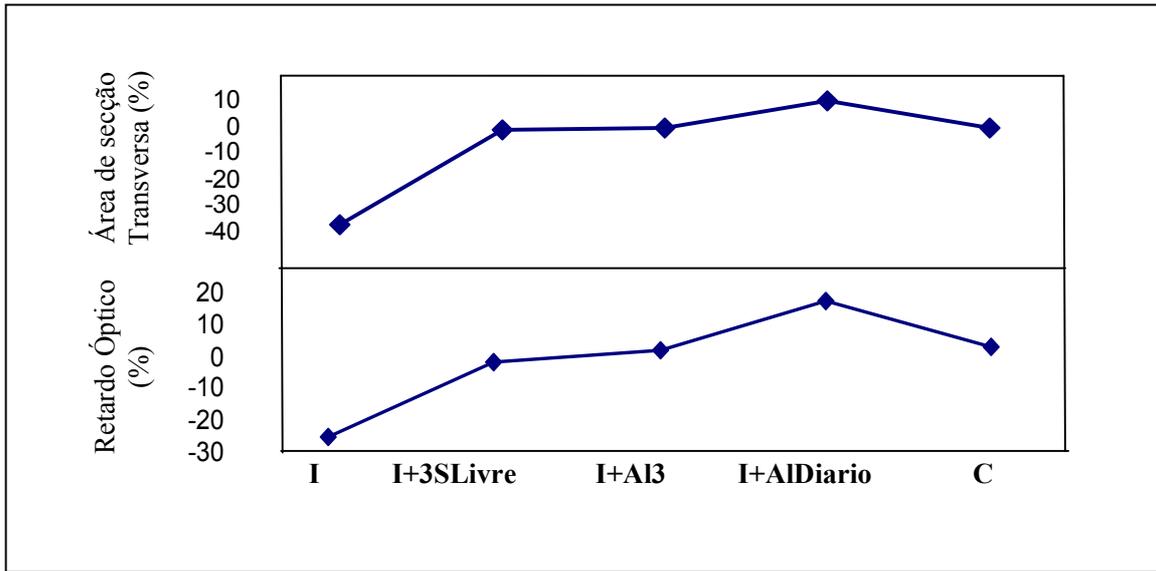


Figura 3

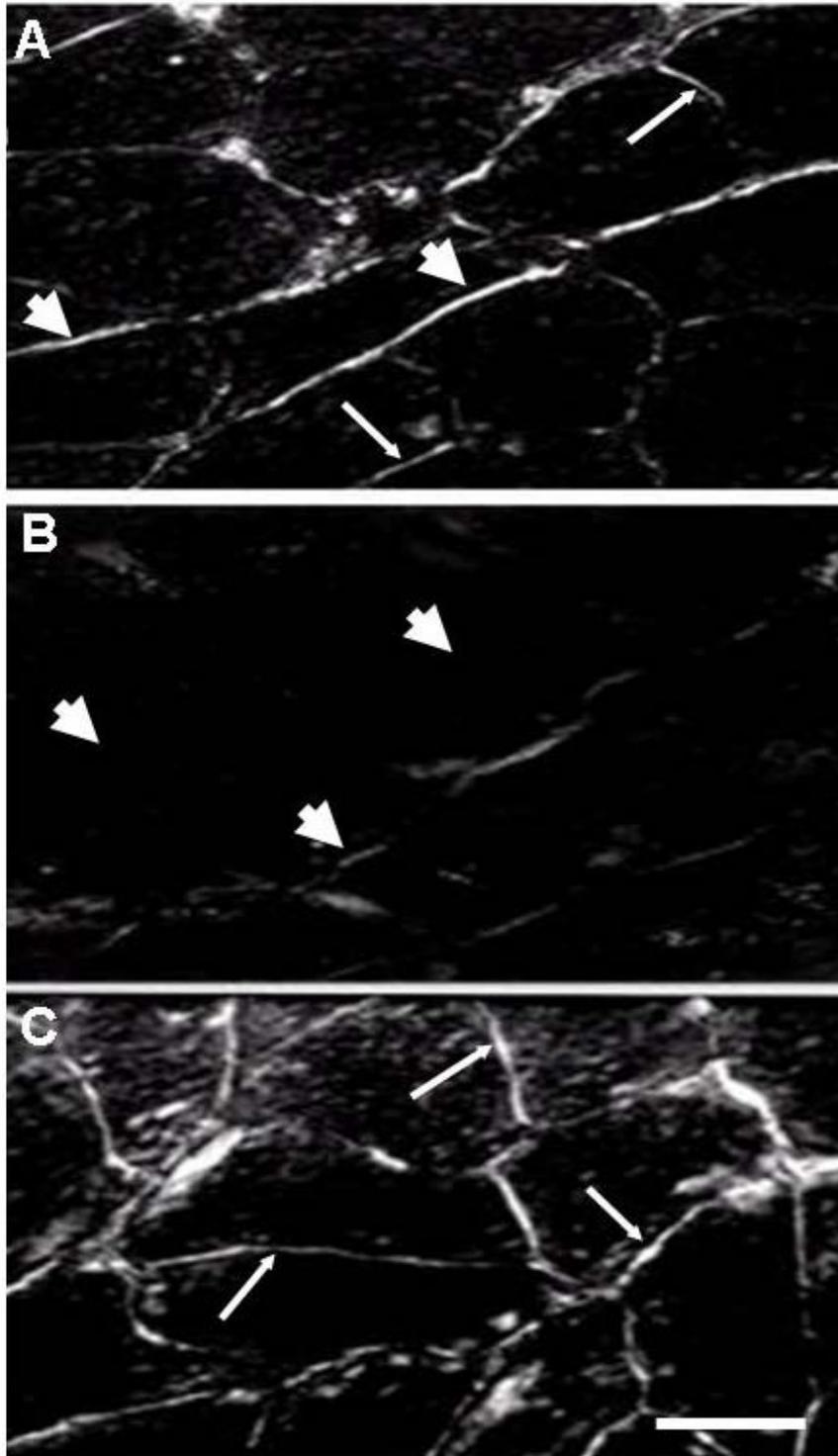


Figura 4

Lista de Figuras

Figura 1: esquema hipotético do tecido conjuntivo entre polarizadores. Quando a fibra de colágeno está a 45° em relação ao plano da luz polarizada é exibido maior brilho e quando está paralela o brilho é extinto.

Figura 2: O efeito de sessões de alongamento passivo na área de secção transversas das fibras dos músculos sóleos. I: músculos sóleo imobilizados em posição de encurtamento por 4 semanas; I+3SLivre: após imobilização, o animal permaneceu livre por 3 semanas; I+A13: após imobilização o músculo sóleo foi alongado 3 vezes por semana durante 3 semanas; I+A1Diário: após imobilização o músculo sóleo foi alongados diariamente por 3 vezes; C: os animais não foram submetidos aos procedimentos de imobilização e alongamento. *P<0,01 quando comparado com o sóleo contralateral. Os resultados são média ± desvio padrão.

Figura 3: Correlação entre a área de secção transversa relativa das fibras musculares e o retardo óptico relativo das birrefringências das fibras de colágeno que representam o estado de agregação das fibras de colágeno. I: músculos sóleo imobilizados em posição de encurtamento por 4 semanas; I+3SLivre: após imobilização, o animal permaneceu livre por 3 semanas; I+A13: após imobilização o músculo sóleo foi alongado 3 vezes por semana durante 3 semanas; I+A1Diário: após imobilização o músculo sóleo foi alongados diariamente por 3 vezes; C: os animais não foram submetidos aos procedimentos de imobilização e alongamento. Os resultados são média ± desvio padrão.

Figura 4. O efeito de sessões de alongamento passivo na organização macromolecular dos feixes de colágenos do músculo sóleo através da birrefringência das fibras de colágeno do TCI. A (Controle): birrefringência intensa nas fibras mais espessas do perimísio (cabeça de setas) e nas fibras mais finas no endomísio (setas). B (Grupo imobilizado): birrefringência fraca (cabeça de seta) ou ausente. C (grupo imobilizado e alongado diariamente): birrefringência intensa nos feixes de colágeno do endomísio (setas) em todo tecido conjuntivo quando comparado com o músculo sóleo controle e imobilizado. Barras: 75 μm .

5 - MANUSCRITO 2

Artigo completo a ser submetido a Physical Therapy

Dez minutos diários de alongamento intermitente aumentam a área da fibra muscular e o número de sarcômeros em série no músculo sóleos encurtados de ratos após a imobilização.

Eliane L. Coutinho (PT, Ms, PhD), Camila DeLuca (PT), Tania F. Salvini (PT, Ms, PhD)*

Unidade de Plasticidade Muscular, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos - CEP 13565-905- São Carlos, SP. Brasil

Endereço para correspondência: Tania F. Salvini. Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos. CEP 13565-905- São Carlos, SP. Brasil. Telefone: (0055-16) 260-8345 / Fax: (0055-16) 261-2081. E-mail: tania@power.ufscar.br

Título resumido: Alongamento intermitente sobre o músculo sóleo encurtado.

Os resultados parciais deste estudo foram apresentados na APS Intersociety Meeting: Integrative Biology of Exercise, Austin, EUA/2004.

Abril, 2006.

Resumo

Dez minutos diários de alongamento intermitente aumentam a área da fibra muscular e o número de sarcômeros em série no músculo sóleo encurtados de ratos após a imobilização.

Justificativa e Objetivo: A frequência e a duração do alongamento intermitente de curta duração não têm sido avaliadas extensivamente. Adicionalmente, o efeito de alongamento passivo manual, comumente usado na reabilitação em músculos encurtados, também não tem sido investigado em detalhes. A finalidade deste estudo foi investigar o efeito do alongamento passivo intermitente aplicado sobre o músculo sóleo encurtado de ratos após a imobilização usando um estudo morfológico. **Animais:** Foram usados 24 ratos Wistar de 16 semanas de idade pesando 281 ± 16 g. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1) soleus imobilizado em posição encurtada por 4 semanas e mantido livre por 3 semanas após a imobilização (Imob); 2) após a imobilização, o sóleo foi alongado manualmente (10 repetições de 60s de alongamento com 30 s de relaxamento), 3 vezes por semana durante 3 semanas (Imob+AL3); 3) após a imobilização o sóleo foi alongado diariamente (Imob+AID); 4) controle (cont). **Métodos:** Os dados foram analisados usando o Student t-test e Anova para comparações múltiplas. **Resultados:** O alongamento diário causou aumento de $13,1 \pm 2,8\%$ do peso muscular e $10 \pm 4,1\%$ ($P < 0.01$) da área de secção transversa quando comparado ao sóleo contralateral, ao grupo Imo+AL3 e ao controle. O alongamento três vezes por semana aumentou $12 \pm 3\%$ o comprimento muscular e $13,5 \pm 5,6\%$ o número de sarcômeros em série quando comparado ao sóleo contralateral, ao grupo Imo+ALD e ao controle ($P < 0.01$). **Conclusão e Discussão:** Os resultados deste estudo sugerem que dez minutos de alongamento intermitente de curta duração é efetivo

para causar hipertrofia muscular. O alongamento intermitente três vezes por semana foi suficiente para induzir a síntese de novos sarcômeros em série, no entanto, apenas o alongamento diário causou hipertrofia radial das fibras musculares encurtadas.

Palavras Chaves: Alongamento muscular, Hipertrofia, Atrofia muscular, Sarcômero, Reabilitação.

Introdução

A imobilização é uma freqüente causa de atrofia e encurtamento muscular. O seu uso após lesões músculo esqueléticas do tornozelo causa severos encurtamentos dos músculos flexores plantares e conseqüentemente perda da dorsoflexão. A prevalência desse encurtamento tem sido de 77% imediatamente após a remoção da imobilização e 22% dois anos após remoção.¹ É também descrito que a imobilização em posição de encurtamento causa diminuição do número de sarcômeros em série e da área de secção transversa das fibras musculares²⁻⁴ reduzindo além da amplitude de movimento (ADM) a força muscular. Tais adaptações são as principais causas de disfunção do movimento em humanos, sendo considerada um grande problema para a reabilitação.⁵⁻⁷

Por outro lado, o alongamento muscular é considerado um excelente estímulo para induzir a adição de sarcômeros em série^{8,3,4} e a hipertrofia radial das fibras musculares.^{9,3,4} Essa adaptação no número de sarcômeros parece produzir um ajuste no comprimento dos sarcômeros afim de que o músculo desenvolva máxima tensão.¹⁰

Goldspink demonstrou que o alongamento ou o aumento de tensão no músculo é o maior contribuinte para o aumento da massa muscular,¹¹ sendo considerado mais importante que a força contrátil induzida por estimulação elétrica para o aumento da síntese de proteínas.¹² Outros autores também têm mostrado que o alongamento passivo contínuo promove crescimento muscular induzindo a hipertrofia radial nas fibras musculares.^{10,13,3,4}

O alongamento passivo realizado de forma intermitente é considerado o tratamento de eleição para músculos encurtados¹⁴⁻¹⁷ no entanto, apenas o alongamento passivo contínuo tem sido amplamente estudado experimentalmente através de análises celulares e

moleculares.^{18,19} Outros trabalhos também têm descrito o efeito benéfico do alongamento passivo em músculos imobilizados,^{20,3,4} no entanto, há uma carência de trabalhos que estudem as alterações morfológicas causadas pelo alongamento passivo intermitente, de curta duração^{21-23,56} em músculos encurtados pós-imobilização. No entanto, o alongamento passivo intermitente manual é muito utilizado na reabilitação, particularmente em pacientes que não conseguem realizá-lo de forma ativa.

Davis et al.²⁴ mostraram que 30 s de alongamento passivo manual, três vezes por semana, em músculos normais de humanos são capazes de aumentar o comprimento muscular. Por outro lado, Feland et al.¹⁴ encontrou que 60 s de alongamento passivo manual diário em músculos de indivíduos idosos produziram maior taxa de ganho de ADM quando comparados com 15 s e 30 s, concluindo que 60 s de duração de alongamento produzem maior ganho de ADM em músculos com severos encurtamentos.

Há evidências que o aumento da carga mecânica aplicada no músculo via alongamento ritmo cause hipertrofia²³ e atenua a atrofia pós-desnervação.²²

Assim, neste estudo optou-se por avaliar o efeito de 60 s de alongamento passivo intermitente, realizado manualmente, com 10 repetições e 30 s de relaxamento entre cada alongamento, 3 e 7 vezes por semana, durante 3 semanas no músculo sóleo de rato encurtado, pós-imobilização do tornozelo em flexão máxima. Os efeitos dessa intervenção na área das fibras e na sarcomerogênese foram avaliados.

Este estudo fornece novas informações sobre a adaptação morfológica das fibras do músculo sóleo, previamente imobilizadas e tratadas com duas frequências de alongamento passivo intermitentes, frequentemente utilizadas na reabilitação em humanos e ainda pouco investigada quanto às adaptações celulares do músculo esquelético.

Método

Animais

Foram usados 24 ratos com 16 semanas de idade, pesando 281 ± 16 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com livre acesso à água e ração, em condições ambientais controlada com $23\pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. O estudo foi aprovado pelo Comitê Ético para Animais e Experimentos da Universidade, que foi desenvolvido do acordo com a declaração de Helsinki. Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xylazina (12 mg/kg) e ketamina (95 mg/kg) para aplicação da imobilização, quando submetidos ao alongamento e durante cirurgia para remoção dos músculos. Após o experimento foram eutanaziados com overdose de anestésico.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 6 animais cada:

1- Imobilizado (Imob): O músculo sóleo esquerdo foi imobilizado, em posição de encurtamento, pela flexão plantar máxima, durante 4 semanas. Após este período os animais ficaram livres na gaiola por 3 semanas.

2- Imobilizado e Alongado três vezes por semana (Imob+A13): O músculo sóleo esquerdo foi mobilizado como previamente descrito e depois de retirada a imobilização foi submetido a 10 alongamentos passivos de 60 s com 30 s de relaxamento entre cada alongamento, 3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira), durante 3 semanas.

3- Imobilizado e Alongado diário (Imob+A1D): Após imobilização por 4 semanas o músculo sóleo esquerdo foi alongado diariamente por 3 semanas como o mesmo protocolo previamente descrito.

4- Controle (Cont) – Os animais foram mantidos livres na gaiola por 7 semanas.

Procedimento

Para manter os músculos sóleos em completa posição de encurtamento foi usado para imobilizar o membro posterior do rato um modelo de imobilização de malha de aço descrito em outros estudos.^{25,3,4}

A articulação tibiotársica foi imobilizada em máxima flexão plantar com fita adesiva e envolta por algodão. Em seguida a imobilização foi ajustada e fixada com fita adesiva, que manteve a articulação tibiotársica em flexão plantar máxima por quatro semanas. A imobilização foi mantida por quatro semanas consecutivas, período que produz uma redução média de 40% do número de sarcômeros em série das fibras do sóleo, conforme o estudo desenvolvido por Tabary et al.² A imobilização foi checada diariamente e ajustada quando necessário para manter máxima flexão plantar (Figura 1).

Esse modelo de imobilização foi previamente testado e reduz em média 44% do peso muscular, 19% do comprimento dos músculos sóleos de ratos e Coutinho et al e Gomes et al. ainda encontraram uma redução média de 23% e 37% no número de sarcômeros em série e na área de secção transversa, respectivamente, após três semanas de imobilização.^{3,4} Este modelo tem algumas vantagens quando comparado com o gesso ou gesso sintético: ele é barato e leve e o mesmo modelo pode ser usado algumas vezes pelo mesmo animal ou por animais de peso similar além de ser facilmente ajustado. Nenhuma úlcera de pele ou ferida foi detectada nos animais durante o período de imobilização.

Foram realizadas 10 sessões de alongamento passivo intermitente manual, cada uma mantida por um período de 60 s intercalados com 30 s de relaxamento, onde a articulação tibiotársica foi mantida em dorso flexão máxima, para alongamento máximo do músculo sóleo (Figura 2). O protocolo foi aplicado diariamente e três vezes por semana durante as

três primeiras semanas após a retirada da imobilização. Este método de alongamento passivo manual foi previamente usado por Ikeda et al.²⁶

Após sete semanas do início do experimento todos os animais foram anestesiados e pesados e ambos os músculos sóleos direito e esquerdo foram cuidadosamente dissecados e removidos. Subseqüentemente os tendões foram fixos com o músculo em posição de repouso, o qual foi definido como L_0 , como previamente descrito por Ansved²⁷ e o comprimento muscular foi determinado. Cada músculo sóleo foi então dividido longitudinalmente em duas partes similares: a porção medial foi usada para avaliação da área de secção transversa enquanto que a porção lateral foi usada às medidas dos sarcômeros.

O número e comprimento dos sarcômeros ao longo de uma única fibra muscular foram determinados pelo método de Williams and Goldspink.²⁸ O músculo foi fixado em posição de repouso (comprimento L_0) em 2,5% de glutaraldeído por 3 h e então removido, colocado em HNO_3 (30%) por dois dias e estocado em glicerol (50%). Após este período cinco fibras individuais foram isoladas de tendão-a-tendão de cada músculo sóleo e montadas e o seu comprimento medido usando um paquímetro.^{73,4} O número e o comprimento dos sarcômeros ao longo de 300 μm foram quantificados em diferentes pontos de cada fibra usando um microscópio de projeção (Axiolab, Carl Zeiss, Germany). Considerando algumas pesquisas conflitantes sobre o comprimento dos sarcômeros ao longo da fibra muscular, particularmente no final da fibra alongada,²⁸⁻³¹ no presente estudo assumimos que o comprimento do sarcômero é homogêneo ao longo de todo comprimento da fibra muscular.

Para avaliar a área das fibras o músculo foi imediatamente congelado em isopentano, resfriado em nitrogênio líquido, e estocado em freezer a $-80^\circ C$ (Forma

Scientific Inc.,USA). Os cortes transversos foram estão obtidos do ventre muscular usando criostato (Microm HE 505, Germany) e os cortes histológicos foram corados com Azul de Toluidina/1% borax para a mensuração da área de secção transversa das fibras musculares, como descrita previamente.^{32,33} As áreas de secções transversas de 100 fibras musculares foram aleatoriamente escolhidas da região central de cada secção transversa de cada músculo sóleo e foram medidas usando um microcópico de luz Axiolab (Carl Zeiss, Germany) e um software para morfologia (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss).

Análise dos dados

O teste Student *t*-test pareado foi usado para comparar os resultados do sóleo direito e esquerdo dos mesmos animais de cada grupo. As possíveis diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste ANOVA 4 X 2 (group X test) Post-hoc e Teste Duncan, com o nível de significância de 5% ($P < 0.05$).

Resultados

Peso Corporal

A imobilização durante quatro semanas não causou perda de peso corporal significativa quando comparado com o peso inicial nos grupos Imob ($267\pm 33\text{g}$ vs $278\pm 34\text{g}$, respectivamente), Imob+A13 ($265\pm 13\text{g}$ vs $282\pm 17\text{g}$, respectivamente) e Imob+A1D ($263\pm 21\text{g}$ vs $290\pm 33\text{g}$, respectivamente). Quando comparado os três grupos imobilizados com o grupo controle que ganhou $19\pm 9\%$ de peso (367 ± 16 vs 309 ± 13 , respectivamente; $p < 0.01$) a imobilização impediu um ganho significativo de peso corporal ($P < 0.01$).

Após três semanas sem a imobilização o grupo Imob ganhou $22\pm 12\%$ de peso corporal comparado com o peso corporal após imobilização ($323\pm 49\text{g}$ vs $267\pm 33\text{g}$, respectivamente; $p < 0.01$). Assim como, o grupo Imob+A1D ganhou $36\pm 3\%$ ($327\pm 13\text{g}$ vs $241\pm 10\text{g}$ respectivamente; $p < 0.01$) o grupo Imob+A13 ganhou $24\pm 5\%$ no peso corporal ($320\pm 20\text{g}$ vs $259\pm 21\text{g}$, respectivamente; $p < 0.01$). No entanto, quando comparado às diferenças percentuais dos grupos entre si, apenas o grupo Imob+A17 foi diferente do controle ($421\pm 27\text{g}$ vs $367\pm 16\text{g}$), ganhando maior peso corporal no período ($p < 0.01$).

Peso e Comprimento Muscular

Após três semanas livres na gaiola os músculos sóleos do grupo Imob apresentaram perda de peso de $10\pm 3,5\%$ quando comparados com os sóleos contralaterais, no entanto, não foi significativa ($0,17\pm 0,02$ vs $0,19\pm 0,01$, respectivamente; Figura 3A). O grupo Imob+A13 recuperou o peso muscular quando comparado com o sóleo direito contralateral ($0,18\pm 0,02$ vs $0,17\pm 0,01$, respectivamente). No entanto, um aumento de $13,1\pm 2,8\%$ no peso muscular foi encontrado nos sóleos esquerdos do grupo Imob+A1D quando comparado com

o sóleo direito contralateral ($0,21\pm 0,02$ vs $0,18\pm 0,03$, respectivamente; $p<0.01$; Figura 3A). Quando comparado o peso muscular dos grupos entre si o grupo Imob+A1D (ganho de $13\pm 3\%$) foi diferente ($p<0.01$) do grupo Imob (perda de $10\pm 3,5\%$) e Cont que não apresentou alterações significativas ($0,2\pm 0,02$ vs $0,2\pm 0,02$, respectivamente, $p>0,05$)

O comprimento do músculo sóleo esquerdo do grupo Imob, não foi diferente do músculo contralateral ($18\pm 2,3\text{mm}$ vs $19,3\pm 2,8\text{mm}$ respectivamente, $p>0,05$; Figura 3B). Assim como, o músculo sóleo esquerdo do grupo Imob+A17 recuperou o comprimento quando comparado com os sóleos direitos contralaterais ($20\pm 1,1\text{mm}$ vs $21,5\pm 0,8\text{mm}$, respectivamente; $p>0,05$). Por outro lado, o grupo Imob+A13 apresentou ganho no comprimento do músculo sóleo esquerdo quando comparado com o sóleo direito contralateral ($24\pm 1,6\text{mm}$ vs $21,4\pm 1,5\text{mm}$ respectivamente, $p<0.01$; Figura 3B). Quando comparado os grupos entre si o grupo Imob+A13 que ganhou $12\pm 3\%$ no comprimento dos músculos sóleos foi estatisticamente diferente ($p<0.01$) do grupo Imob ($18\pm 2,3\text{mm}$ vs $19,3\pm 2,8\text{mm}$ respectivamente; $p>0,05$) e Cont (22 ± 1 vs 22 ± 1 , respectivamente; $p>0,05$) que não apresentaram alterações significativas (Figura 3B).

Área das Fibras Musculares

Os grupos Imob e Imob+A13 recuperaram a área de secção transversa das fibras dos músculos sóleos esquerdos quando comparados com os sóleos direitos contralaterais ($2172\pm 583 \mu\text{m}^2$ vs $2184\pm 543\mu\text{m}^2$, $p>0.05$ e $2334\pm 989 \mu\text{m}^2$ vs $2323\pm 814 \mu\text{m}^2$, $p>0,05$ respectivamente) (Figura 3C). Por outro lado, o sóleo esquerdo do grupo Imob+A17 apresentou um aumento de $10\pm 3,1\%$ ($p<0.05$) quando comparado com o sóleo direito contralateral ($2345\pm 832 \mu\text{m}^2$ vs $2118\pm 824 \mu\text{m}^2$, $p<0,01$; respectivamente; Figura 3C). Ao comparar os grupos entre si, apenas o grupo Imob+A17, que apresentou aumento na área,

foi estatisticamente ($p < 0.05$) diferente dos grupos Imob e controle (3724 ± 984 vs 3718 ± 894 , $p > 0.05$) que não apresentaram mudanças significativas entre os sóleos direito e esquerdo (Figura 3C).

Número e Comprimento dos Sarcômeros

O grupo Imob após três semanas da retirada da imobilização recuperou o número de sarcômeros em série das fibras dos músculos sóleos esquerdos comparados com os sóleos contralaterais (132 ± 17 vs 137 ± 13 , respectivamente; Figura 4B). No grupo Imob+A13 o número de sarcômeros em série do sóleo esquerdo aumentou quando comparado com o sóleo direito contralateral (155 ± 12 vs 138 ± 15 , respectivamente; $P < 0.01$). O grupo Imob+A17 também aumentou $7,9 \pm 3,9\%$ do número de sarcômeros em série quando comparado com o sóleo direito contralateral (143 ± 13 vs 134 ± 12 , respectivamente; $P < 0.05$) (Figura 4A). Ao comparar as diferenças relativas dos grupos entre si apenas o grupo Imob+A13 que aumentou $13 \pm 5,6\%$ no número de sarcômeros em série foi diferente do grupo Imob e do controle que não apresentaram alterações significativas quando comparado o sóleos esquerdo com o direito (132 ± 17 vs 137 ± 13 , $p > 0.05$ e 145 ± 7 vs 149 ± 18 , respectivamente; $P > 0.05$).

Os músculos sóleos imobilizados e submetidos ao alongamento 3 vezes por semana apresentaram uma diminuição no comprimento dos sarcômeros de $10,5 \pm 3\%$ quando comparado com os sóleos direitos contralaterais ($2,0 \pm 0,2$ vs $2,2 \pm 0,3$ respectivamente; $P < 0.01$), assim como, o grupo alongado 7 vezes por semana diminuiu $6,3 \pm 1,4\%$ dos comprimentos dos sarcômeros quando comparado com os sóleos direitos contralaterais ($2,1 \pm 0,2$ vs $2,2 \pm 0,3$ respectivamente; $P < 0.05$).

O grupo Imob não apresentou alteração no comprimento dos sarcômeros quando comparado o sóleo esquerdo com o direito contralateral ($2,2\pm 0,2$ vs $2,2\pm 0,2$ respectivamente; Figura 4B). Quando comparado os grupos entre si apenas o grupo Imob+A13, que perdeu $10,5\pm 5\%$ do comprimento dos sarcômeros, foi diferente do grupo Imob e do controle que não apresentaram diferenças significativas entre os sóleos esquerdos e os contralaterais ($2,0\pm 0,2$ vs $2,0\pm 0,1$ respectivamente; $P>0.05$).

Quando aplicado o teste de correlação entre o número de sarcômeros em série e o comprimento dos sarcômeros de todos os grupos observou-se uma alta correlação com $r=0,97$ ($p<0.05$, Figura 4C)

Discussão

O resultado mais interessante deste estudo foi que o alongamento passivo intermitente realizado de forma manual no músculo esquelético encurtado pós-imobilização, técnica comumente usada na fisioterapia, causou hipertrofia das fibras musculares. Foi também interessante observar que as adaptações do número de sarcômeros e da área da fibra ocorreram de formas diferentes, as quais foram moduladas pela frequência do estímulo onde, o alongamento diário e três vezes por semana causou aumento do número de sarcômeros em série enquanto que apenas o alongamento diário induziu um aumento da área das fibras musculares.

Número e comprimento dos sarcômeros

O presente estudo mostrou que 3 semanas livres na gaiola, após a remoção da imobilização, foram suficientes para que os músculos encurtados recuperassem o número de sarcômeros em série. Embora, este efeito benéfico da marcha sobre a recuperação do número de sarcômeros em série em músculos de roedores já tenha sido descrito há quase três décadas atrás por Godspink,³⁴ apenas recentemente foi mostrado que essa recuperação é assegurado pelo ângulo de dorsoflexão do tornozelo, durante a fase de apoio da marcha, que apresenta um ângulo médio de 45°, colocando o músculo sóleo em máxima tensão de alongamento.³⁵ Isto assegura que o músculo funcione num ótimo comprimento em relação ao ângulo articular.^{36,37} No entanto, não poderíamos inferir tais efeitos em músculos de humanos.

O alongamento passivo realizado diariamente e 3 vezes por semana, durante 10 minutos intermitente, causou aumento do número de sarcômeros em série, o que mostra que o alongamento realizado manualmente de forma intermitente gera um estímulo capaz de

ativar os mecanismos hipertróficos,²⁹ induzindo a síntese de novos sarcômeros, como já visto em outros trabalhos que usaram o alongamento passivo mantido.^{38,3,4}

Neste estudo ficou claro o efeito hipertrófico do alongamento através da adição de sarcômeros ao longo das fibras encurtadas, no entanto, um resultado interessante foi que o alongamento realizado 3 vezes por semana foi tão eficaz quanto o alongamento 7 vezes por semana para aumentar a síntese de novos sarcômeros em série quando comparado com sóleo direito contralateral, assim como, foi mais eficaz quando comparado com o controle. Esses resultados indicam que o alongamento 3 vezes por semana foi melhor que o alongamento diário para estimular em maior proporção os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na síntese de novos sarcômeros ao longo da fibra encurtada.

Um estudo interessante realizado por Ikeda et al¹⁹ para avaliar o efeito hipertrófico do alongamento mostrou que 2 horas de alongamentos repetidos em músculos sóleos de ratos causou um aumento de 12% da expressão do gene c-fos, considerado o disparo inicial para a hipertrofia e após 4 horas de alongamento nenhum aumento foi encontrado quando comparado com o controle. O autor concluiu que o menor tempo foi mais eficaz para estimular a expressão desse gene. Embora no nosso estudo não tenha sido avaliada a expressão desses genes podemos sugerir que não há uma relação direta entre frequência de estímulo e a expressão de genes ligados a hipertrofia. Assim, nossos resultados mostram que a menor frequência de alongamento (3xsem) foi melhor que a frequência maior (7xsem) para estimular à síntese de novos sarcômeros.

Além do número de sarcômeros, um outro importante componente na adaptação muscular ao estímulo do alongamento é o comprimento desses sarcômeros. Esse comprimento de linha Z a linha Z representa uma importante variável anatômica que influencia a tensão máxima desenvolvida durante contração muscular e pode ser alterado

tanto pela imobilização quanto pelo alongamento.³⁹ O presente estudo suporta essa afirmação, visto que, o comprimento dos sarcômeros diminuiu em ambos os grupos alongados 7 e 3 vezes por semana. A diminuição do comprimento dos sarcômeros nos músculos alongados foi associado com o aumento do número de sarcômeros em série os quais envolvem um ajuste no comprimento dos sarcômeros para que o músculo desenvolva uma ótima tensão^{36,37}. Assim tais adaptações permitem que o músculo produza uma ótima força no novo comprimento do músculo alongado.^{36,37}

Área de secção transversa

Assim como, houve a recuperação do número de sarcômeros a área das fibras musculares foi recuperada após 3 semanas livres na gaiola. Achados similares também foram encontrados em outros estudos^{23,40,41} que atribuíram a recuperação da área à ativação da síntese protéica causada pela força de tensão no músculo sóleo durante a atividade na gaiola. Embora, esse efeito benéfico da remobilização livre ocorra na maioria dos estudos com animais, um estudo realizado por Shaffer et al. mostrou que apenas o mecanismo da marcha não é capaz de recupera o comprimento e o trofismo de músculos encurtados pós-imobilização em humanos.⁴²

Uma interessante observação é que o alongamento passivo manual 3 vezes por semana, comumente usado nos programas de reabilitação^{14,43} não teve nenhum efeito adicional à atividade livre na gaiola. Por outro lado, o alongamento passivo manual 7 vezes por semana aumentou a área de secção transversa em cerca de 10% em relação ao sóleo contralateral. Esses resultados nos mostram que o aumento da área das fibras musculares foi dependente da frequência, ou seja, 10 min de alongamento intermitente manual realizado diariamente foram mais efetivos para estimular os mecanismos musculares

hipertróficos que 3 vezes por semana. Segundo Glass⁴⁴ essa hipertrofia ocorre como resultados da adição de filamentos contráteis na miofibrila, aumentando não só a AST, mas em grandes proporções a força muscular. Esse efeito hipertrófico do alongamento muscular é bem descrito na literatura,^{13,14,19,45} no entanto, nenhum destes estudos analisou o efeito hipertrófico do alongamento passivo intermitente, realizado manualmente, considerando parâmetros de duração e frequência comumente usados na reabilitação.^{42,43}

Porque o aumento da área de ST foi modulado por uma frequência maior de alongamento pouco se sabe.⁴⁶ Acredita-se que as integrinas (mecanossensores) que ligam a matriz extracelular ao citoesqueleto^{46,47} possam funcionar como transdutores do sinal mecânico do alongamento, regulando a expressão gênica de células musculares e que elas devam ser ativadas de acordo com a frequência do estímulo.⁴⁸ Os nossos resultados mostram que o alongamento passivo diário causou melhor resposta na AST, isto poderá ser um indicativo que os mecanossensores são mais ativados durante frequências maiores de alongamento passivo manual. Desta forma, justificaria o fato de 10 min de alongamento manual intermitente, 7 vezes por semana, ser melhor para aumentar área de secção transversa de músculos encurtados.

O estudo realizado por Ikeda,¹⁹ já descrito, também mostrou que o alongamento passivo durante 4 horas foi mais eficaz que 2 horas para estimular a expressão da miogenina, considerada um fator de transcrição miogênico da hipertrofia. O autor conclui que uma duração maior do alongamento passivo é necessária para ativar esses fatores miogênicos. Com base neste estudo poderíamos inferir que tal efeito poderá ocorrer em relação à frequência de alongamento, o que também justificaria o alongamento 7 vezes ser mais eficaz que três vezes para induzir a hipertrofia radial.

Já é bem descrito na literatura que o alongamento muscular regula de forma diferente o número de sarcômeros em série e a área de secção transversa das fibras. Segundo Koh and Tidball³⁷ uma das possíveis vias moduladoras da adição de sarcômeros é a via do óxido nítrico (NO) derivado da isoforma neuronal do óxido nítrico (nNOS), enquanto que a via da PI3K/AKT⁴⁴ (uma serina-teonina kinase) está envolvida na regulação da hipertrofia e ambas são ativadas pelo alongamento estático.⁶² No entanto, qual a frequência e duração de estímulo necessário para ativar essas vias em maior ou menor proporção ainda não se sabe. Contudo, podemos sugerir que neste estudo o alongamento 7 e 3 vezes por semana influenciaram a via de adição de sarcômeros em série, embora o alongamento 3 vezes por semana tenha sido mais vantajoso. Por outro lado, o alongamento 7 vezes por semana parece ter influenciado a via da hipertrofia radial das fibras musculares.

Peso e comprimento muscular

Os músculos sóleos do grupo imobilizado e livre na gaiola recuperam o peso e o comprimento muscular após 3 semanas livre na gaiola. Esses resultados mostram que a descarga de peso corporal na articulação do tornozelo, durante a marcha, foi suficiente para estimular a síntese protéica do músculo sóleo, conforme já identificado em diversos estudos.^{23,40,41}

Neste estudo o alongamento 7 vezes por semana causou aumento no peso muscular e como já descrito causou também um aumento da área de secção transversa das fibras musculares. Isso mostra que o peso do músculo apresenta uma relação direta com a área de secção transversa.⁴⁸

Alguns estudos mostraram que o aumento do comprimento da fibra muscular está associado com o aumento do número de sarcômeros ao longo da fibra

muscular.^{16,48} Isto suporta nossos resultados que mostram que o alongamento causou aumento no comprimento muscular e no número de sarcômeros em série, mostrando uma relação entre o comprimento e o número de sarcômeros.

O fato do número de sarcômeros ter aumentado 13,5% e 7,9% nos músculos alongados 3 e 7 vezes por semana respectivamente e o comprimento muscular ter aumentado estatisticamente apenas nos músculos alongados 3 vezes por semana poderia ser explicado pelo fato que o ganho percentual de 7,9 % no número de sarcômeros em série nos músculos alongados 7 vezes por semana não foi suficiente para refletir no comprimento da fibra muscular. No entanto os músculos alongados 3 vezes por semana tiveram um aumento de 13,5%, ou seja, quase 50% mais que o alongamento 7 vezes por semana o que influenciou no comprimento muscular.

O presente estudo mostrou que o alongamento passivo intermitente de curta duração durante 3 semanas em músculos previamente imobilizados influenciou positivamente tanto na síntese de novos sarcômeros em série quanto em paralelo. O alongamento manual, de 10 minutos intermitentes, 3 vezes por semana foi suficiente para aumentar o número de sarcômeros ao longo da fibra. No entanto, nossos achados não indicaram a necessidade de alongamento 7 vezes por semana para aumentar o comprimento muscular. Por outro lado o alongamento passivo 7 vezes por semana foi necessário para causar aumento radial da fibra muscular. Desta forma, se estudos como estes tiverem uma aplicação clínica, o alongamento intermitente 3 vezes por semana poderá ser aplicado para aumentar o comprimento muscular e o alongamento intermitente diário poderá ser indicado para aumentar o trofismo muscular em pacientes com fraquezas musculares. Desta forma, mais estudos considerando estas condições de alongamentos deve ser feitos.

Conclusão

Dez minutos de alongamento intermitente realizado diariamente e três vezes por semana, em músculos encurtados, induziram a hipertrofia muscular. O estímulo mecânico decorrente do alongamento passivo de curta duração em ambas as frequências semanais aumentou a síntese de novos sarcômeros ao longo da fibra, enquanto que, apenas o alongamento diário aumentou a área de secção transversa. O alongamento passivo intermitente mostrou uma efetividade no aumento do trofismo radial e longitudinal em músculos encurtados pos imobilização.

Agradecimentos

Esta pesquisa teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brasil. As alunas de doutorado e iniciação científica tiveram suas bolsas de estudos financiadas pela CAPES e FAPESP, respectivamente (Agências Brasileiras). Os autores agradecem ao Dr. Jorge Oishi pela ajuda na análise estatística e a Tereza F. Piassi pela assistência técnica.

Referências

1. Chesworth BM, Vandervoort AA. Comparison of passive stiffness variables and range of motion in uninvolved and involved ankle joints of patients following ankle fractures. *Phys Ther* 1995;75(4):253-61.
2. 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(1):231-44.
3. Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Oishi J, Salvini TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(12):1853-61.
4. Gomes AR, Coutinho EL, Franca CN, Polonio J, Salvini TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(10):1473-80.
5. Herbert RD, Balnave RJ. The effect of position of immobilisation on resting length, resting stiffness, and weight of the soleus muscle of the rabbit. *J Orthop Res* 1993;11(3):358-66.
6. Hortobagyi T, Dempsey L, Fraser D, Zheng D, Hamilton G, Lambert J, Dohm L. Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol* 2000;1;524 Pt 1:293-304.
7. Goldspink G, Williams P, Simpson H. Gene expression in response to muscle stretch. *Clin rthop Relat Res* 2002; (403 Suppl): S146-52.
8. Cox VM, Williams PE, Wright H, James RS, Gillott KL, Young IS, Goldspink DF. Growth induced by incremental static stretch in adult rabbit latissimus dorsi muscle. *Exp Physiol* 2000;85(2):193-202.

9. Antonio J, Gonyea WJ. Progressive stretch overload of skeletal muscle results in hypertrophy before hyperplasia. *J Appl Physiol* 1993;75(3):1263-71.
10. Koh TJ, Herzog W. Excursion is important in regulating sarcomere number in the growing rabbit tibialis anterior. *J Physiol* 1998;1;508 (Pt 1):267-80.
11. Goldspink DF. The influence of denervation and stretch on the size and protein turnover of rat skeletal muscle [proceedings]. *J Physiol* 1977;269(1):87P-88P.
12. Goldspink DF, Cox VM, Smith SK, Eaves LA, Osbaldeston NJ, Lee DM, Mantle D. Muscle growth in response to mechanical stimuli. *Am J Physiol* 1995; 68(2 Pt 1):E288-97.
13. Alway SE, Winchester PK, Davis ME, Gonyea WJ. Regionalized adaptations and muscle fiber proliferation in stretch-induced enlargement. *J Appl Physiol* 1989;66(2):771-81.
14. Worrell TW, Smith TL, Winegardner J. Effect of hamstring stretching on hamstring muscle performance. *J Orthop Sports Phys Ther* 1994;20(3):154-9.
15. Bressel E, McNair PJ. The effect of prolonged static and cyclic stretching on ankle joint stiffness, torque relaxation, and gait in people with stroke. *Phys Ther* 2002;82(9):880-7.
16. Gajdosik RL, Vander Linden DW, McNair PJ, Riggin TJ, Albertson JS, Mattick DJ, Wegley JC. Slow passive stretch and release characteristics of the calf muscles of older women with limited dorsiflexion range of motion. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2004;19(4):398-406.
17. Feland, J. B. et al. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. *Physical Therapy* 2001;81(5): 1111-1117.

18. Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, Jaenicke T, Gerlach GF. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am J Physiol* 1992;262(3 Pt 2):R356-63.
19. Adachi R, Yabusaki K, Obinata T. Uptake of albumin is coupled with stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle cells in culture. *Zoolog Sci* 2003;20(5):557-65.
20. Williams PE. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. *Ann Rheum Dis*.1988;47(12):1014-6.
21. Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Tanaka N. Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84(3):419-23.
22. Sakakima H, Yoshida Y. Effects of short duration static stretching on the denervated and reinnervated soleus muscle morphology in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*. 2003 Sep;84(9):1339-42.
23. Kannus P, Jozsa L, Järvinen TLN, Kvist M, Vienot T, Järvinen TAH, Natri A & Järvinen M. Free mobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology* 1998;84:1418-1424.
24. Davis DS, Ashby PE, McCale KL, McQuain JA, Wine JM. The effectiveness of 3 stretching techniques on hamstring flexibility using consistent stretching parameters. *J Strength Cond Res* 2005;19(1):27-32.
25. Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(11):1329-32.

26. Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Horinouchi K, Tanaka N. Induction of myogenin messenger ribonucleic acid in rat skeletal muscle after 1 hour of passive repetitive stretching. *Arch Phys Med Rehabil* 2004;85(1):166-7.
27. Ansved T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1995;154: 291-302.
28. Williams PE & Goldspink G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. *Journal of Cell Science* 1971;9: 751-767.
29. Tardieu C, Tabary JC, Tabary C & Huet de La Tour E Comparison of the sarcomere number adaptation in young and adult animals. *Journal of Physiology* 1977;73: 1045-1055.
30. Matano T, Tamai K & Kurokawa T Adaptation of skeletal muscle in limb lengthening: a light diffraction study on the sarcomere length in situ. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1994; 12: 193-196.
31. Tamai K, Kurokawa T & Matsubara I In situ observation of adjustment of sarcomere length in skeletal muscle under sustained stretch. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi. Journal of the Japanese Orthopaedic Association* 1989; 63: 1558-1563.
32. Salvini TF, Morini CC, Araujo HSS & Ownby CH. Long-term regeneration of fast and slow murine skeletal muscles after induced injury by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Broad-Banded Copperhead) venom. *Anatomical Record* 1999;254: 521-533.
33. Minamoto VB, Bunho SR & Salvini TF Regenerated skeletal muscle of rat after periodic contusions. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001;34: 1447-1452.

34. Goldspink DF. The influence of denervation and stretch on the size and protein turnover of rat skeletal muscle [proceedings]. *J Physiol* 1977;269(1):87P-88P.
35. Varejao AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Filipe VM, Gabriel RC, Ferreira AJ, Geuna S, Winter DA. Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve* 2003;27(6):706-14.
36. Koh TJ, Tidball JG. Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *Physiol* 1999;15;519 Pt 1:189-96.
37. Lieber RL, Ljung BO, Friden J. Intraoperative sarcomere length measurements reveal differential design of human wrist extensor muscles. *J Exp Biol* 1997;200(Pt1):19-25.
38. Goldspink DF, Easton J, Winterburn SK, Williams PE, Goldspink GE. The role of passive stretch and repetitive electrical stimulation in preventing skeletal muscle atrophy while reprogramming gene expression to improve fatigue resistance. *J Card Surg* 1991;6(1 Suppl):218-24.
39. Zemková H, Teisinger J, Almon RR, Vejsada R, Hník P & Vyskocil F. Immobilization atrophy and membrane properties in rat skeletal. *Pflügers Archive. European Journal of Physiology* 1990, 16: 126-129.
40. Seki K, Taniguchi Y, Narusawa M. Effects of joint immobilization on firing rate modulation of human motor units. *J Physiol* 2001;1;530(Pt 3):507-19.
41. Shaffer, M. A., et al. Effects of immobilization on plantar-flexion torque, fatigue resistance, and functional ability following an ankle fracture. *Physical Therapy* 2000;80(8): 1-16.

42. Chan SP, Hong Y, Robinson PD. Flexibility and passive resistance of the hamstrings of young adults using two different static stretching protocols. *Scand J Med Sci Sports*. 2001 Apr;11(2):81-6.
43. Bandy, W. D., Iron J. M., Briggler, M. The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscle. *Phys Ther*.1997;77: 1383:1389.
44. Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 2003;5(2):87-90.
45. Ruwhof C, van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 2000;Jul;47(1):23-37.
46. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 3;69(1):11-25.
47. Ross RS, Pham C, Shai SY, Goldhaber JI, Fenczik C, Glembotski CC, Ginsberg MH, Loftus JC. Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1998; 15;82(11):1160-72.
48. Shah SB, Peters D, Jordan KA, Milner DJ, Friden J, Capetanaki Y, Lieber RL. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol* 2001;204 (Pt10):1703-10.

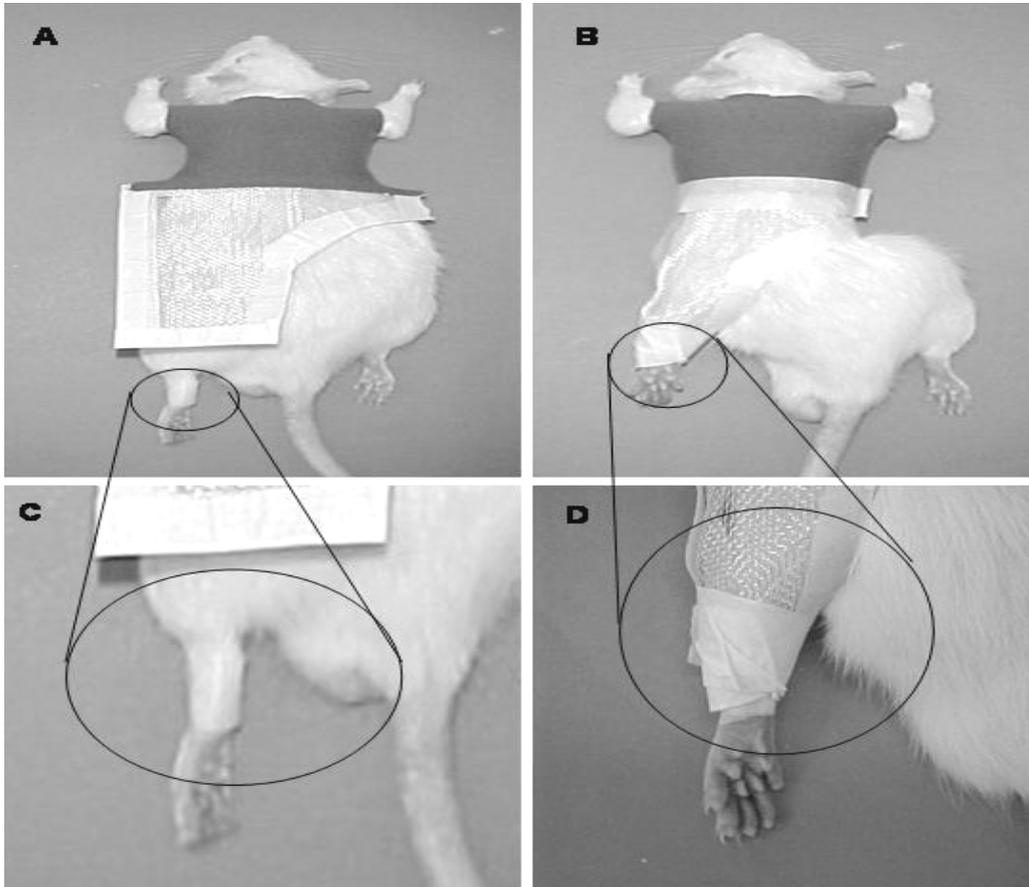


Figura 1

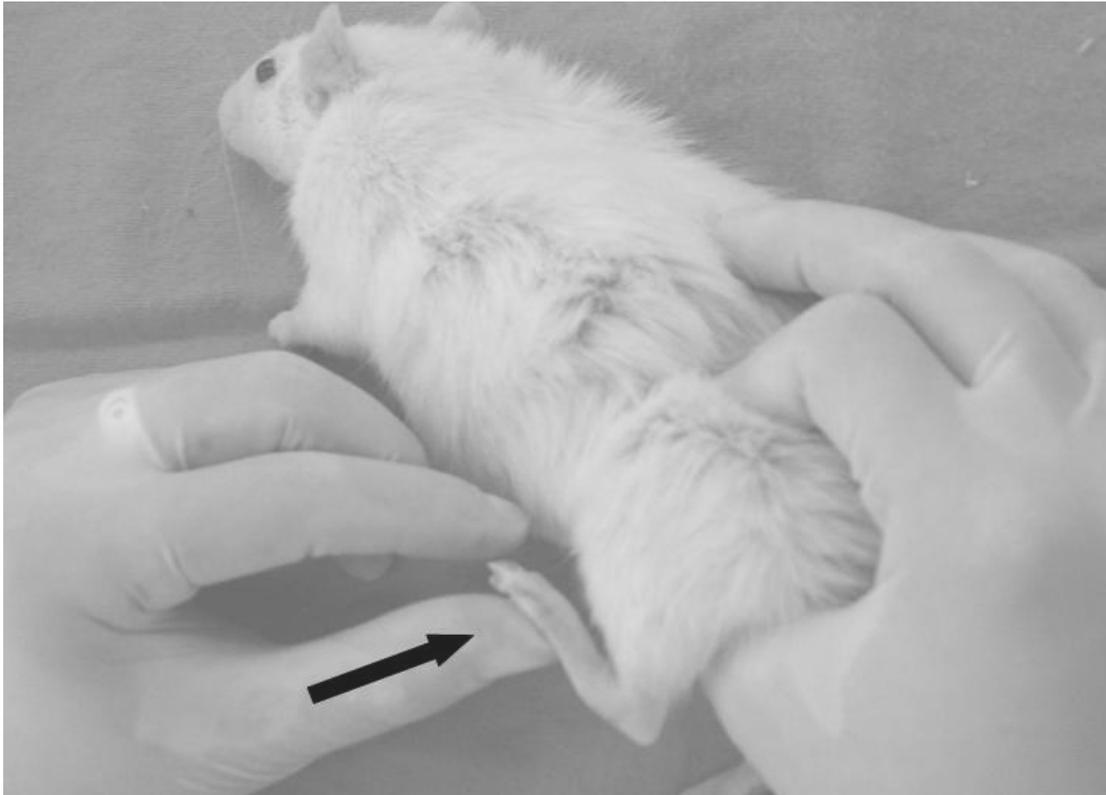


Figura 2

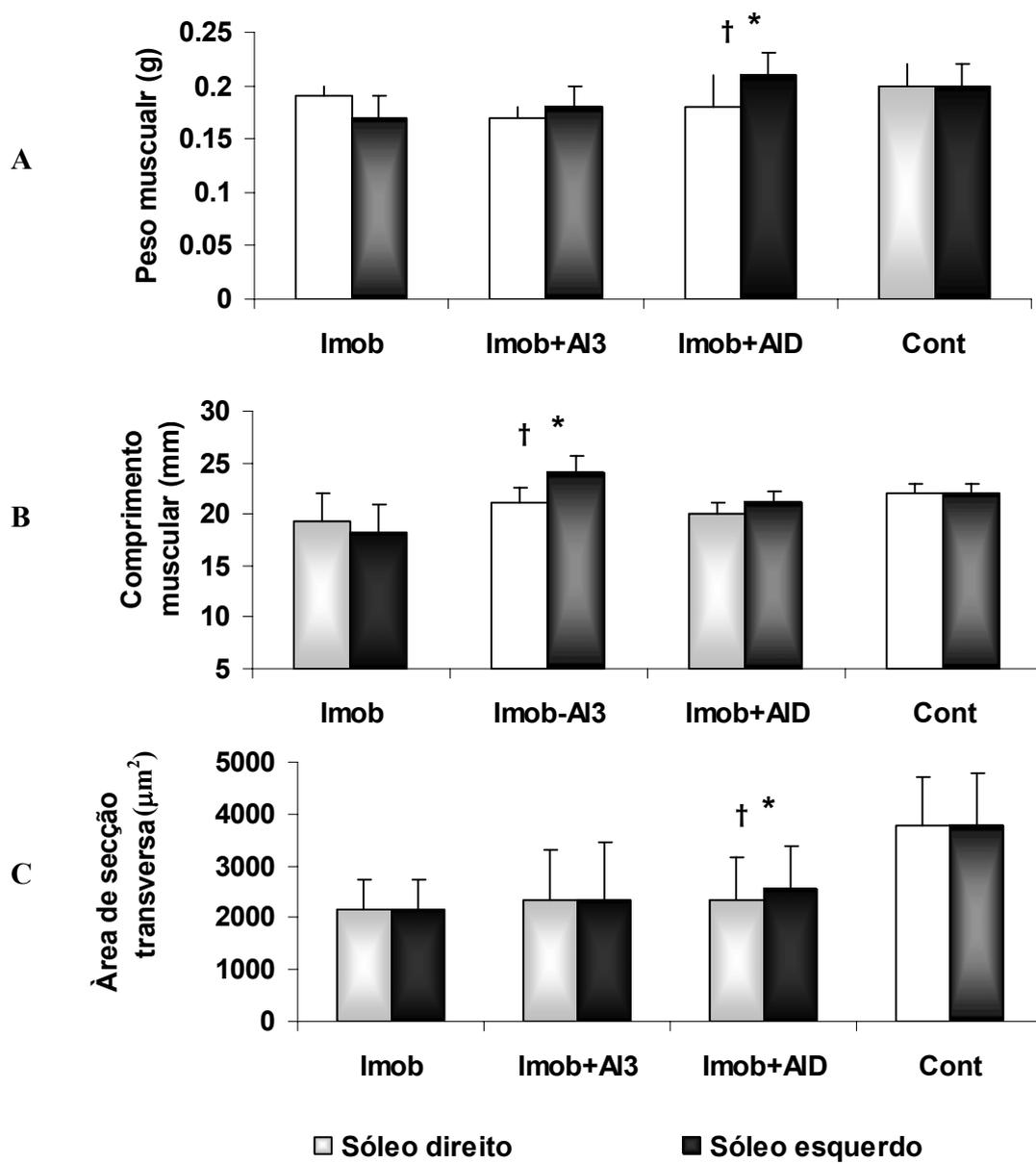


Figura 3

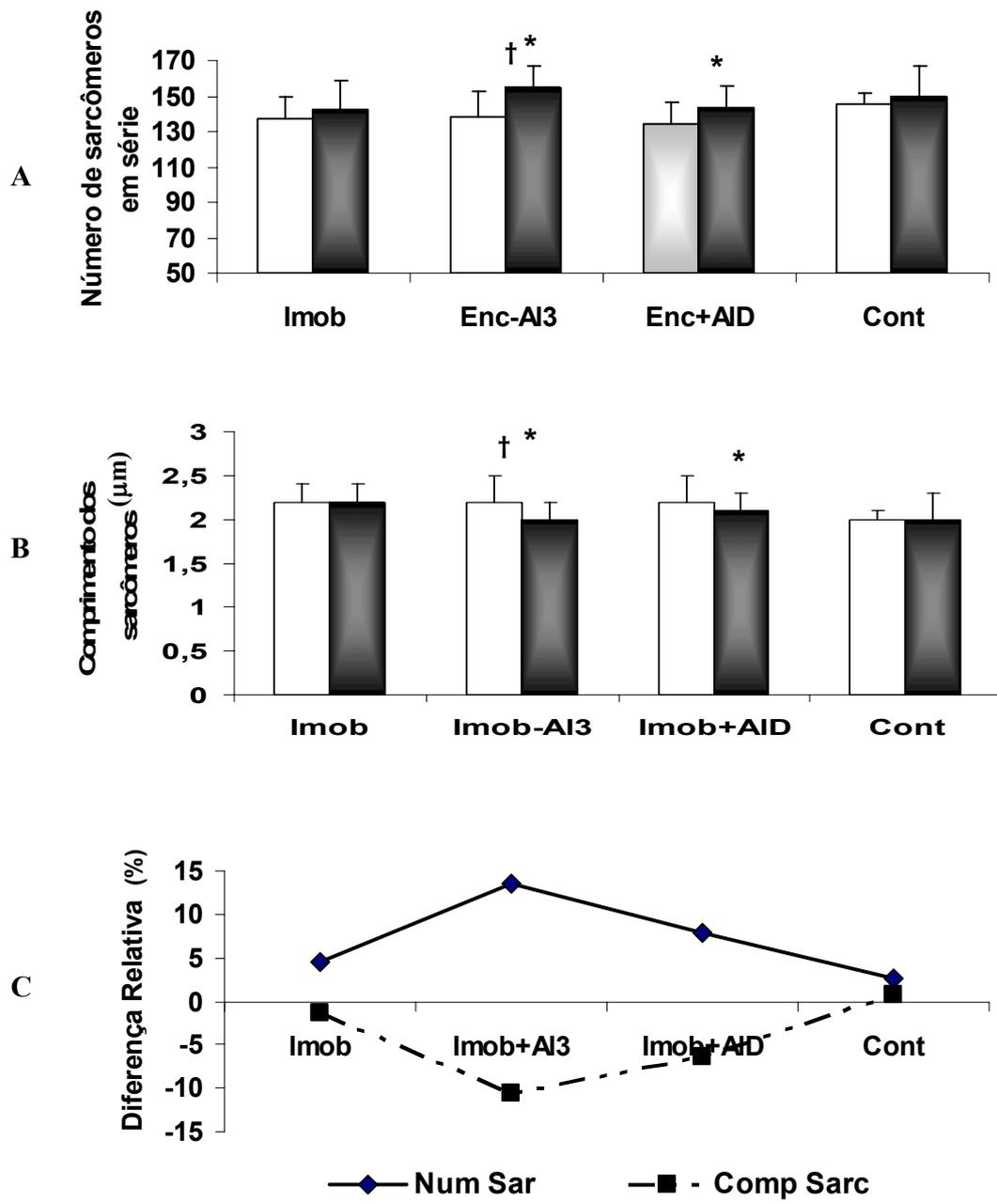


Figura 4

LEGENDAS

FIGURA 1: Protocolo de imobilização com malha de aço. A: parte superior de malha de coton flexível fixada as partes inferiores de malha de aço; B: a imobilização ajustada ao corpo e articulação do tornozelo esquerdo do animal através de fita adesiva com o tornozelo imobilizado em máxima flexão plantar; C: detalhes da articulação do tornozelo esquerda imobilizada em flexão plantar máxima com fita adesiva; D: detalhe da articulação do tornozelo imobilizada com a malha de aço. Para maiores detalhes ver Coutinho, Gomes, França and Salvini, 2003.

FIGURA 2: Alongamento passivo manual do músculo sóleo realizado através da flexão máxima da articulação tibiotársica.

FIGURA. 3. A: Peso muscular; B: Comprimento dos músculos sóleos ao final de sete semanas; C: Área de secção transversa das fibras dos músculos sóleos. Imob= músculo sóleo encurtado e livre 21 dias, Imob+A13= músculo sóleo encurtado e alongado três vezes por semana, Imob+A1D= músculo sóleo encurtado e alongado diariamente, Cont= Grupo Controle. * $p < 0,01$ comparado com o músculo sóleo direito contralateral; † $p < 0,01$ comparado com o grupo Imob e o Cont. Os valores são em média \pm desvio padrão.

FIGURA 4. A: Número de sarcômeros em série do músculo sóleo. B: Comprimento dos sarcômeros do músculo sóleos; C: Correlação entre o número e o comprimento dos sarcômeros em série ao final de sete semanas ($r= 0.97$). Imob= músculo sóleo encurtado e livre 21 dias, Imob+A13= músculo sóleo encurtado e alongado três vezes por semana, Imob+A1D= músculo sóleo encurtado e alongado diariamente, Cont= Grupo Controle. * $p<0,01$ comparado com o músculo sóleo direito contralateral; † $p<0,01$ comparado com o grupo Imob e o Cont. Os valores são em média \pm desvio padrão.

6- MANUSCRITO 3

Artigo Completo a ser submetido à Medicine and Science in Sports and Exercise

Adaptação do músculo sóleo de ratos durante 3 semanas de alongamento intermitente passivo: Análise morfológica da fibra muscular e da organização macromolecular do colágeno

Eliane L. Coutinho, Camila DeLuca, Benedito C. Vidal, Tania F. Salvini*

Unit of Muscle Plasticity, Department of Physical Therapy, University Federal of São Carlos - CEP 13565-905- São Carlos, SP. Brazil

*Corresponding author:

Tania F. Salvini

Department of Physical Therapy,

University Federal of São Carlos

CEP 13565-905- São Carlos, SP. Brazil

Phone: (0055-16) 3251-8345 / Fax: (0055-16) 6251-2081

e-mail: tania@power.ufscar.br

Título corrido: Adaptação do músculo sóleo ao alongamento intermitente.

Abril, 2006

RESUMO

1. Coutinho, E. L., C. DeLuca, B. C. Vidal, T. F. Salvini. Adaptação do músculo sóleo de ratos durante 3 semanas de alongamento passivo intermitente: Análise morfológica da fibra muscular e da organização macromolecular do colágeno. *Med. Sci. Sports Exerc.* **Objetivo:** Avaliar a influência de um programa de 3 semanas de alongamento passivo intermitente no músculo sóleo, em duas frequências semanais, no peso e comprimento muscular, número de sarcômeros em série, área de secção transversa e organização macromolecular do colágeno. **Métodos:** Dezoito ratos foram divididos em 3 grupos: 1) o músculo sóleo foi alongado por 60s com 10 repetições e 30 s de relaxamento entre cada alongamento, 3 vezes semana durante 3 semanas (A13); 2) os sóleos foram alongados 7 vezes por semana (A17); 3) controle (cont). Após 3 semanas os sóleos foram retirados e pesados. A metade do músculo foi usada para a avaliação da área da fibra e do retardo óptico da birrefringência e a outra para a avaliação do número e do comprimento dos sarcômeros em série. **Resultados:** O alongamento 3 e 7 vezes por semana causou aumento no peso muscular ($7,8 \pm 2,7\%$ e $16,7 \pm 2,7\%$, respectivamente; $p < 0,05$) e foram diferentes entre si ($P < 0,05$) e causou aumento no comprimento muscular ($10,1 \pm 3,0\%$ e $7,0 \pm 2,7\%$, respectivamente; $p < 0,05$) e também foram diferentes entre si ($P < 0,05$). Os grupos A13 e A17 aumentaram o número de sarcômeros em série ($10,0 \pm 3,0\%$ e $6,0 \pm 2,1\%$, respectivamente; $p < 0,05$), no entanto apenas o grupo A13 foi diferente do Controle ($p < 0,05$). Por outro lado, apenas o grupo A17 aumentou a área de secção transversa ($11,5 \pm 1,8\%$ $P < 0,01$) e o retardo óptico das birrefringências ($9,8 \pm 2,1\%$, $P < 0,01$). **Conclusão:** Três semanas de alongamento passivo intermitente induziu

hipertrofia em músculos sóleos saudáveis. No entanto, o alongamento 3 vezes por semana causou maior influencia na adição de sarcômeros em série enquanto que, o alongamento 7 vezes por semana induziu a maior hipertrofia radial das fibras musculares e organização macromolecular das fibras de colágeno. Caso este estudo tenha uma aplicação prática, o alongamento intermitente, de curta duração, poderá ser usado em programas de condicionamento físico e reabilitação para ganho de flexibilidade e trofismo muscular. **Palavras Chaves:** Alongamento Manual Hipertrofia, Alongamento intermitente, Músculo Sóleo, Organização do Colágeno, Flexibilidade.

INTRODUÇÃO

2. Flexibilidade é um importante componente dos programas de condicionamento físico, sendo solicitada como coadjuvante para treinamento de força e potência muscular (32). Investigações clínicas e básicas têm proposto que músculos não submetidos a alongamentos periódicos irão desenvolver encurtamentos musculares e diminuição da flexibilidade e força, causando desequilíbrio articular e perda do alinhamento postural, o que levaria a lesões e disfunções articulares (29). Esse encurtamento muscular pode resultar dos efeitos combinados da perda de sarcômeros em série e desorganização do tecido conjuntivo intramuscular (TCI) (19,42).
3. O TCI é constituído predominantemente de fibras de colágeno e garante não apenas uma organização dentro dos fascículos e fibras, mas contribui importantemente para a transmissão de força de tensão durante contração e alongamento muscular (19,26). As dimensões e organização do TCI irão influenciar na habilidade do músculo alongar-se e liberar energia (29) durante os movimentos, reduzindo a média de energia necessária durante a marcha ou a corrida (6)
4. O alongamento muscular é considerado um excelente estímulo para induzir a adição de sarcômeros em série (14), o arranjo das fibras de colágeno (20,40,42) e a hipertrofia radial das fibras musculares (5,4). É usado efetivamente para aumentar a amplitude de movimento (ADM) em atletas e pacientes em programas de condicionamento físico e reabilitação (26,31,25).

5. Estudos realizados previamente mostraram que o alongamento passivo mantido por 40 min uma e três vezes por semana durante quatro semanas em músculos sóleo normais de ratos induziu a síntese de novos sarcômeros em série e o aumento da área de secção transversa das fibras musculares (8,16). Estudos importantes também descreveram o efeito do exercício de alongamento passivo mantido na hipertrofia (4,9,13,18) e na síntese e organização de colágeno intramuscular (20). No entanto, existem poucos trabalhos (18,33) que avaliem o efeito do alongamento passivo intermitente, na hipertrofia muscular e na organização macromolecular do colágeno, usando tempo curto de alongamento, comumente usado em programas de condicionamento físico e reabilitação.
6. O tempo de alongamento suficiente para aumentar da ADM de indivíduos normais varie entre 10 e 60 seg (7,10), no entanto, alguns trabalhos mostram que apenas alongamentos passivos contínuos por período relativamente longos produzem hipertrofia (1,3,4,14). Se o alongamento passivo intermitente por um tempo relativamente curto induz o crescimento muscular ele deverá ter muitos benefícios para os programas de condicionamento físico e reabilitação.
7. A proposta deste estudo foi investigar a influencia de três semanas de alongamento muscular intermitente realizado manualmente com 10 repetições de 60 s de alongamento, e 30 s de relaxamento entre cada alongamento, 3 e 7 vezes por semana, na sarcomerogênese, na área de secção transversa das fibras musculares e na organização macromolecular do colágeno do tecido conjuntivo intramuscular de músculos sóleos saudáveis de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Animais e grupos

1. Foram usados 18 ratos com 18 semanas de idade, pesando 356 ± 11 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em condições ambientais controladas com $23\pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xylazina (12 mg/kg) e ketamina (95 mg/kg) para aplicação do alongamento e durante cirurgia para remoção dos músculos. Após o experimento os animais foram eutanaziados com overdose de anestésico. O estudo foi aprovado pelo Comitê Ético para Animais e Experimentos da Universidade, que foi desenvolvido do acordo com a declaração de Helsinki.
2. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de 6 animais cada:

Alongamento 3 vezes por semana (A13): Os músculos sóleos esquerdos foram submetidos a 10 repetições de alongamentos de 60 s com 30 s de relaxamento, três vezes por semana ao longo de três semanas.

Alongamento 7 vezes por semana (A17): Os músculos sóleos esquerdos foram submetidos a 10 repetições de alongamentos de 60 s com 30 s de relaxamento, sete vezes por semana ao longo de três semanas.

Controle (Cont) – Os animais foram mantidos livres na gaiola durante 7 semanas.

Protocolo de alongamento muscular passivo intermitente

3. Para se efetuar a técnica de alongamento no músculo sóleo, os animais foram previamente anestesiados. Foram realizadas 10 sessões de alongamento passivo manual, por um período de 60 s intercalados com 30 s de relaxamento, onde a

articulação tibiotársica foi mantida em dorso flexão máxima, para alongamento máximo do músculo sóleo. O protocolo foi aplicado 3 e 7 vezes por semana durante as 3 primeiras semanas após a retirada da imobilização. Este método de alongamento passivo manual foi previamente usado por Ikeda et al. (18).

Morfologia e medidas dos sarcômeros

4. Após sete semanas do início do experimento todos os animais foram anestesiados e pesados e ambos os músculos sóleos direito e esquerdo foram cuidadosamente dissecados. Subseqüentemente os tendões foram presos com o músculo em posição de repouso, o qual foi definido como L_0 , como previamente descrito por Ansved (2) e o comprimento muscular foi determinado. Cada músculo sóleo foi então dividido longitudinalmente em duas partes: a porção medial foi usada para histologia enquanto que a porção lateral foi usada para as medidas dos sarcômeros.
5. O número e comprimento dos sarcômeros ao longo de uma única fibra muscular foram determinados pelo método de Williams and Goldspink (41) O músculo foi fixado em posição de repouso (comprimento L_0) em 2,5% de glutaraldeído por 3 h e então removido, colocado em HNO_3 (30%) por dois dias e estocado em glicerol (50%). Após este período cinco fibras individuais foram isoladas de tendão-a-tendão de cada músculo sóleo e montadas e o seu comprimento medido usando um paquímetro. O número e o comprimento dos sarcômeros ao longo de 300 μm foram quantificados em diferentes pontos de cada fibra usando um microscópio de projeção (Axiolab, Carl Zeiss, Germany). Considerando algumas pesquisas conflitantes sobre o comprimento dos sarcômeros ao longo da fibra muscular, particularmente no final da fibra alongada (36,41) no presente estudo nós

assumimos que o comprimento do sarcômero é homogêneo ao longo de todo comprimento da fibra muscular.

6. Para histologia o músculo foi imediatamente congelado em isopentano, resfriado em nitrogênio líquido, e estocado em freezer a -80°C (Forma Scientific Inc., Marietta, Oh,USA). Os cortes transvesos foram estão obtidos do ventre muscular usando criostato (icrom HE 505, Germany) e os cortes histológicos foram corados com Azul de Toluidina/1% borax para a avaliação morfológica das medidas das áreas das fibras musculares, como descrita previamente (30).

Análise das áreas das fibras musculares

7. As áreas de secções transversas de 100 fibras musculares foram aleatoriamente escolhidas da região central de cada secção transversa de cada músculo sóleo e foram medidas usando um microcópio de luz Axiolab (Carl Zeiss, Germany) e um software para morfologia (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss).

Medidas de birrefringência

8. A análise dos feixes de colágeno do tecido conjuntivo dos músculos sóleos foi realizada utilizando uma de suas propriedades anisotrópicas ópticas: a birrefringência total (birrefringência textural + birrefringência intrínseca). Essa análise foi realizada através da microscopia de polarização. A birrefringência total do tecido conjuntivo do músculo sóleo (endomísio e perimísio) foi medida através do retardo óptico que representa o estado de agregação molecular do colágeno (40).
9. As medidas de birrefringência foram realizadas através da determinação de valores de Retardos Ópticos (ROs) que são a soma das birrefringências intrínseca e textural

dos feixes de colágeno, quando os cortes são embebidos em água. Para a efetivação da análise de birrefringência total das fibras de colágeno as lâminas histológicas foram imersas por 30 minutos em água destilada, cujo índice de refração é $n = 1,333$ (38). Após o período de imersão, as lâminas foram cobertas por lamínulas, contendo água destilada nas interfaces.

10. As medidas dos retardos ópticos ROs foram obtidas através da microscopia de luz polarizada no microscópio Zeiss, com uma objetiva 10x, luz monocromática com λ (546 nm) e compensador de Sénarmont $1 / 4 \lambda$.
11. É conhecido que a 45° , em relação aos polarizadores, as fibras de colágeno exibem o maior brilho de birrefringência e conseqüentemente um alto valor de RO, isso ocorre devido à maioria das fibras de colágeno se orientam no eixo longo das fibras musculares. Assim, as medidas dos ROs foram feitas orientando-se as fibras a 45° (Figura 1).
12. Foram realizadas 100 medidas de OR para cada músculo dos grupos estudados com o eixo orientado a 45° do polarizador (máxima birrefringência). As medidas foram feitas em diferentes pontos do endomísio e perimísio do músculo sóleo direito e esquerdo, totalizando 1200 medidas para cada um dos cinco grupos estudados.

Fotodocumetação

13. Fotomicrografias foram obtidas com microscópio Axioplan 2 Zeiss (Oberköchery/Minich, Germany) equipado com objetivas Neiofluar, fator 2 optovar, um condensador 1.4 e um filme Kodak Gold ISSO 100.

Análise Estatística

14. O teste Student *t*-test pareado foi usado para comparar os dados do sóleo direito e esquerdo dos mesmos animais de cada grupo. As possíveis diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste ANOVA (Post Hoc e Tukey), com o nível de significância de 5% ($P < 0.05$).

RESULTADOS

Peso corporal e muscular

15. Após três semanas de alongamento passivo manual os animais não apresentaram diferença significativa no peso corporal, no entanto, o grupo controle apresentou aumento significativo de $15\pm 8,8\%$ ($P<0.01$) ao final das 3 semanas (Tabela 1). Quando comparado o peso corporal dos grupos entre si, ambos os grupos alongados foram estatisticamente ($P<0.01$) maiores que o grupo controle.

16. O peso dos músculos alongados 7 vezes por semana aumentou $16,7\pm 4,5\%$ ($P<0.05$) enquanto que, os músculos alongados 3 vezes por semana não apresentaram diferença significativa quando comparado com os sóleos direitos contralaterais. Apenas o grupo A17 foi estatisticamente ($P<0.05$) maior que o grupo controle (Tabela 1).

Comprimento muscular

17. O comprimento dos músculos sóleos alongados 3 e 7 vezes por semana aumentou $10,1\pm 5,6\%$ e $7,0\pm 2,7\%$ ($P<0.05$), respectivamente. Quando comparado os grupos entre si, o grupo A13 foi estatisticamente diferente do grupo A17 e do grupo controle (Tabela 1).

Análise Morfológica

Número e comprimento dos sarcômeros em série

18. O músculo sóleo esquerdo do grupo A13 aumentou $10,0 \pm 3,0\%$ no número de sarcômeros em série quando comparado o sóleo direito contralateral (154 ± 24 vs 140 ± 14 ; respectivamente; $P < 0.01$). O alongamento 7 vezes por semana aumentou $6,0 \pm 2,1\%$ no número de sarcômeros em série do sóleo esquerdo quando comparado com o sóleo direito contralateral (159 ± 9 vs 150 ± 13 ; respectivamente; $P < 0.01$). Quando comparado às diferenças relativas dos grupos entre si, o grupo A13 foi estatisticamente diferente do grupo AL7 e controle ($10 \pm 3\%$ vs $2,7 \pm 1,2\%$, respectivamente; $P < 0.01$; Figura 1), apresentando maior número de sarcômeros em série ao final das três semanas de alongamento intermitente.
19. Por outro lado, o comprimento dos sarcômeros no grupo alongado 3 vezes por semana diminuiu $15,3 \pm 3,6\%$ quando comparado com o sóleo direito contralateral ($1,8 \pm 0,1$ vs $2,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ respectivamente, $p < 0,01$; Figura 2), assim como no grupo alongado 7 vezes por semana diminuiu $5,5 \pm 1,4\%$ quando comparado com o sóleo contralateral ($2,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ vs $2,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$; respectivamente; $P < 0.01$; Figura 2). Ambos foram diferentes do controle ($P < 0.01$).

Área de secção transversa dos músculos sóleos (AST)

20. As alterações na área de secção transversa das fibras musculares estão descritas na Figura 2. Os músculos sóleos esquerdos do grupo A13 não apresentaram diferença significativa quando comparado com o sóleo direito contralateral (2395 ± 857 vs 2470 ± 849 , respectivamente), no entanto, os músculos sóleos esquerdos do grupo

A17 aumentaram $11,5 \pm 1,8\%$ da AST quando comparado com o sóleo direito contralateral ($2621 \pm 827 \mu\text{m}^2$ vs $2369 \pm 642 \mu\text{m}^2$, respectivamente; $P < 0.01$).

21. Quando comparado os grupos entre si, o grupo A17 apresentou uma AST estatisticamente ($P < 0,01$) maior que grupo A13 e o controle ($2,5 \pm 0,5\%$ e $-0,1 \pm 0,03\%$, respectivamente; $P < 0.01$; Figura 2).

Retardos ópticos das birrefringências

22. O retardo óptico das fibras de colágeno do tecido conjuntivo dos músculos sóleos esquerdos do grupo A17 apresentou um aumento significativo quando comparado como sóleo direito contralateral ($11,9 \pm 2,1$ vs $9,9 \pm 1,6$ respectivamente, $P < 0.01$; Tabela 2). Por outro lado, o grupo A13 não apresentou diferença significativa entre os sóleos direitos e esquerdos ao final das 3 semanas de alongamento ($10,8 \pm 2,2$ vs $10,6 \pm 3,2$; respectivamente; Figura 2). Quando comparado os grupos entre si, apenas o grupo A17 foi estatisticamente diferente do grupo A13 e Cont ($3,8 \pm 0,9$ e $2,7 \pm 1,2\%$, respectivamente; $P < 0.01$; Tabela 2).

Análise morfológica do tecido conjuntivo intramuscular

23. Os músculos alongados 7 vezes por semana apresentaram maior birrefringência (intensidade de brilho) nos feixes de colágeno do TCI tanto no endomísio quanto no perimísio (Figura 3A) quando comparado com o controle que apresenta um brilho uniforme e menos intenso (Figura 3B). Por outro lado, a birrefringência dos músculos alongados 3 vezes por semana não foi diferente do controle.

Comparação dos dados do músculo contralateral com o controle

24. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as medidas de peso muscular, comprimento muscular, número e comprimento dos sarcômeros, áreas das fibras musculares e retardo óptico das birrefringências das fibras de colágenos do músculo direito e do músculo controle. Foi usado para comparar os grupos o teste Anova (Post-hoc e Tukey) com nível de significância $P < 0.05$.

DISCUSSÃO

25. O presente estudo mostrou que o alongamento passivo intermitente realizado manualmente em músculos sóleos saudáveis causou hipertrofia das fibras musculares e maior organização do tecido conjuntivo intramuscular. No entanto, os resultados mostraram que as duas frequências de alongamentos modularam de formas diferentes o número de sarcômeros, a área da fibra e a organização das fibras de colágenos, onde, o alongamento 3 vezes por semana induziu maior aumento do número de sarcômeros em série enquanto que, o alongamento 7 vezes por semana causou maior aumento da área das fibras musculares e maior organização macromolecular do colágeno intramuscular.

Número e comprimento dos sarcômeros

26. O alongamento intermitente em ambas as frequências causou aumento do número de sarcômeros em série, como descrito em outros estudos que usaram alongamento passivo mantido (1,9,14,15,41).

27. Foi interessante notar neste estudo que o aumento no número de sarcômeros em série embora tenha ocorrido em ambos os grupos alongados 3 e 7 vezes por semana, o aumento não teve uma relação direta com o a quantidade de estímulos que eles receberam. Por exemplo, os músculos alongados 3 vezes por semana aumentaram 10% o número de sarcômeros enquanto que os músculos alongados sete apresentaram um aumento de 6% em relação ao sóleo contralateral (Tabela 1 e Figura 1). Embora, o alongamento 3 e 7 vezes por semana tenha induzido a síntese de novos sarcômeros nenhuma diferença foi encontrada entre ambos alongamentos,

indicando que 3 vezes por semana foi tão efetivo quando 7 vezes. No entanto, a resposta do crescimento longitudinal no músculo sóleo foi mais vigorosa quando submetido a menor frequência de alongamento (3xsem) comparado com o alongamento 7 vezes e o controle.

28. O motivo pelo qual a frequência de estímulo influencia os mecanismos de síntese de sarcômeros em série parece estar relacionado com a expressão de genes específicos da hipertrofia (11,18). Um estudo comparou o efeito hipertrófico do alongamento intermitente em sóleos de rato após 2 e 4 horas de alongamento e encontrou que após 4 horas nenhum efeito hipertrófico foi encontrado quando comparado com o controle. Por outro lado, 2 horas de alongamentos causou um aumento de 12% da expressão do gene c-fos, considerado o disparo inicial para a hipertrofia. O autor concluiu que o menor tempo foi mais eficaz para estimular a expressão desse gene (18). Considerando que não houve uma relação entre a duração do estímulo e hipertrofia, poderemos inferir que também não há uma relação entre frequência de estímulo e síntese de novos sarcômeros em série. Desta forma, nossos achados também mostraram que a frequência de alongamento 3 vezes por semana foi melhor que 7 vezes por semana para estimular à adição de sarcômeros ao longo da fibra muscular quando comparado com o controle. Um estudo clínico também demonstrou que um menor número de repetições de alongamento passivo (uma sessão) é tão eficaz quanto alongamentos com maior número de repetições (três sessões) para aumentar a ADM de jovens atletas (5).

29. O alongamento passivo intermitente causou também ajuste no comprimento dos sarcômeros. Esta interpretação está de acordo com os resultados encontrados que mostram que o comprimento dos sarcômeros diminuiu nos músculos alongados três

e sete vezes por semana, indicando que o músculo ajusta o comprimento funcional dos sarcômeros pela adição de novos sarcômeros (14,23,34). Estes resultados mostram que à medida que o número de sarcômeros aumenta ocorre uma diminuição adaptativa dos comprimentos até que ele atinja um comprimento funcional ao novo comprimento muscular (12,23,42)

Área de secção transversa

30. A adaptação da massa muscular ao alongamento passivo tem sido bem explorada em animais (1,3,18). Segundo Stauber (33) após 4 semanas de alongamentos mecânicos rápidos (10 alongamento a cada 13s -10mm/s) sete vezes por semana a área das fibras do músculo sóleo de ratos aumentou 13% comparado com o sóleo contralateral. No presente estudo, um aumento parecido de 10% foi também observado nos músculos submetidos ao alongamento intermitente 7 vezes por semana de forma lenta. Em contrapartida nenhuma alteração foi observada nos músculos alongados 3 vezes por semana. Este resultado mostra que a hipertrofia radial das fibras teve uma relação direta com a frequência com que elas foram alongadas.

31. Se o aumento da AST é modulado, principalmente, por uma frequência diária de alongamento ainda não é conclusivo. No entanto, é bem descrito na literatura que o alongamento contínuo durante semanas em músculos de aves induz a hipertrofia (3,4,17) assim como, alongamentos por 40 min a cada três dias e uma vez por semanas em ratos também causam hipertrofia (8,16). Acredita-se que esse mecanismo hipertrófico seja ativado pelas integrinas (proteínas transmembrana) as quais interagem com o citoesqueleto desencadeando a síntese protéica (24). No

entanto, a ativação desses sinais intramusculares na indução de síntese de novos sarcômeros em paralelo parece ser maior por frequências diárias de estímulos (27). Desta forma, justificaria o fato de apenas o alongamento intermitente realizado diariamente ter causado aumento na área de secção transversa dos músculos sóleos.

32. Um experimento interessante em ratos (18) mostrou que quanto maior o tempo de alongamento passivo intermitente maior a expressão da miogenina (fator de transcrição miogênico da hipertrofia), o estudo conclui que uma duração maior do alongamento passivo é necessária para ativar esses fatores miogênicos envolvidos na hipertrofia. Talvez um efeito similar tenha ocorrido na área de secção transversa com a aplicação de alongamento intermitente diário, onde a síntese de sarcômeros em paralelo foi regulada pela maior frequência de estímulo.

Peso e comprimento muscular

33. Como descrito na figura 1, os músculos alongados sete vezes por semana aumentaram estatisticamente seus pesos, esse aumento do peso é resultado do crescimento circunferencial. Por outro lado, o aumento do comprimento dos músculos três e sete vezes por semana pode ser justificado pelo aumento dos sarcômeros em série. A relação do peso muscular com a AST e o comprimento muscular com o número de sarcômeros também foi encontrada por outros autores (3,31).

Birrefringências das fibras de colágeno.

34. A birrefringência dos músculos sóleos alongados três vezes por semana não sofreu nenhuma alteração, por outro lado, o exercício de alongamento diário foi a melhor

- freqüência de estímulo para aumentar a reorganização macromolecular do colágeno do TCI quando comparado com o grupo alongado 3 vezes por semana e o controle.
35. Acredita-se que o estímulo de alongamentos em maiores freqüências cause maior ajuste das fibras de colágenos, induzindo uma maior orientação das moléculas de tropocolágeno (22), o que levaria a um aumento na birrefringência (40).
36. De acordo com estudos experimentais o aumento da birrefringência das fibras de colágeno após exercício físico é decorrente do aumento da birrefringência textural que define o estado de agregação e orientação dos feixes de colágeno do tecido conjuntivo intramuscular (38,39). Isto corresponde a feixes de colágeno mais alinhados e com mais condições de empacotamento molecular que o controle (28,40). Assim, de acordo com os nossos resultados o aumento da birrefringência total das fibras de colágeno do tecido conjuntivo intramuscular após o alongamento sete vezes por semana pode sugerir um aumento da birrefringência textural, o que causaria uma maior reorganização macromolecular e maior birrefringências das fibras de colágenos.
37. A morfologia dos músculos alongados 7 vezes por semana mostra variações na birrefringência (alteração no brilho), onde os feixes de colágeno do tecido conjuntivo intramuscular apresentam maior brilho. Segundo alguns estudos o aumento dessa birrefringência é resultado da tensão aumentada nas fibras de colágeno causado pelo exercício de alongamento (28). Assim, nossos resultados mostram que o estado de agregação das fibras de colágeno pode ser influenciado pela freqüência do alongamento passivo intermitente. Também se pode especular que o alongamento diário resulte no aumento da remodelação do colágeno para

reorganização do tecido, causando aumento da rede de colágeno da matriz muscular e provavelmente maior birrefringência (20).

38. Assim como a AST respondeu melhor ao alongamento intermitente diário os mecanismos adaptativos no TCI também sofreram maior influência do alongamento realizado diariamente. No entanto, quais os mecanismos responsáveis pela resposta do músculo e do colágeno a diferentes frequências de alongamentos pouco se sabe. Alguns estudos mostram que o alongamento regula de forma diferente o número de sarcômeros em série e a área de secção transversa das fibras musculares (13,21). A adição de sarcômeros em série é provavelmente regulada pela via do NO (óxido nítrico) derivado da isoforma neuronal do óxido nítrico NOS (21), enquanto que, a hipertrofia radial é possivelmente regulada pela via da PI3K/AKT (uma serina-teonina kinase) (13) e ambas são influenciadas pelo alongamento estático. No entanto, podemos sugerir que essas vias são moduladas por frequências de alongamentos diferentes, visto que, três vezes por semana de alongamento intermitente foi mais eficaz para estimular a síntese de novos sarcômeros enquanto que, o alongamento intermitente diário induziu o aumento da AST.

39. O colágeno também é modulado por via diferente e sua ativação pode ser influenciada pela frequência de estímulo. A via da MAPK (Proteína Kinase Ativada-Miogenicamente) é a mais provável envolvida na síntese de colágeno que é ativada principalmente pelo alongamento (30).

40. Baseado nestes resultados pode-se concluir que o alongamento intermitente por três semanas realizado diariamente em músculos sóleos normais causou hipertrofia e maior organização do tecido conjuntivo. Por outro lado, o mesmo alongamento realizado três vezes por semana não foi suficiente para alterar organização

macromolecular do colágeno do TCI e o trofismo radial muscular, mas induzindo ao aumento de sarcômeros em série. Assim, podemos inferir que o alongamento manual intermitente em músculos esqueléticos de ratos regulou a área de secção transversa e a organização do tecido conjuntivo por mecanismos similares. Estes achados mostram a importância do uso do alongamento passivo intermitente realizado de forma manual para aumentar o trofismo e o arranjo das fibras de colágeno do tecido conjuntivo. Caso este estudo tenha uma aplicação prática este tipo de alongamento intermitente poderá ser usado em programas de condicionamento físico para ganho de trofismo e força.

Validade do músculo contralateral

41. A escolha do músculo contralateral como controle foi investigado neste experimento. Nenhuma variável analisada no músculo sóleo direito contralateral ao músculo sóleo esquerdo alongado apresentou diferença significativa quando comparada com o grupo controle. Estes resultados mostram a validação do membro contralateral como controle. O uso do músculo contralateral como controle tem algumas vantagens: ele minimiza não apenas o número de animais necessário, mas também, o tempo requerido para o cuidado dos animais e para as cirurgias e fornece equivalência da mesma amostra para análise estatística (37). No entanto, procedimentos como a imobilização articular não devem acontecer para quando for usar o membro contralateral como controle (44). Se mudanças sistêmicas ocorrem durante imobilização, o músculo contralateral pode confundir a interpretação dos dados. Baseado nestas alterações é contestado o uso o membro contralateral como controle quando o estudo é feito com imobilização (36).

CONCLUSÃO

Três semanas de alongamento passivo intermitente induziu hipertrofia em músculos sóleos saudáveis. No entanto, o alongamento 3 vezes por semana causou maior influencia na adição de sarcômeros em série enquanto que o alongamento 7 vezes por semana induziu a maior hipertrofia radial das fibras musculares e organização macromolecular das fibras de colágeno do tecido. Diferentes mecanismos podem ocorrer para a hipertrofia muscular e organização do tecido conjuntivo causado pelo alongamento passivo intermitente. Caso este estudo tenha uma aplicação prática este tipo de alongamento intermitente poderá ser usado em programas de condicionamento físico e reabilitação para ganho de tamanho e força muscular.

AGRADECIMENTOS

42. Esta pesquisa teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brasil. As alunas de doutorado e iniciação científica tiveram suas bolsas de estudos financiadas pela CAPES e FAPESP, respectivamente (Agências Brasileiras). Os autores agradecem ao Dr. Jorge Oishi pela ajuda na análise estatística e a Tereza F. Piassi pela assistência técnica.

REFERENCES

1. Alway SE, Winchester PK, Davis ME, Gonyea WJ. Regionalized adaptations and muscle fiber proliferation in stretch-induced enlargement. *J Appl Physiol.* 66(2):771-81, 1989.
2. Ansved T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiologica Scandinavica.* 154:291-302, 1995.
3. Antonio J, Gonyea WJ. Progressive stretch overload of skeletal muscle results in hypertrophy before hyperplasia. *J Appl Physiol.* 75(3):1263-71, 1993.
4. Antonio J, Gonyea WJ. Role of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia in intermittently stretched avian muscle. *J Appl Physiol.* 74(4):1893-8, 1993.
5. Bandy WD, Irion JM, Briggler M. The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. *Phys Ther.* 77(10):1090-6, 1997.
6. Biewener AA, Roberts TJ. Muscle and tendon contributions to force, work, and elastic energy savings: a comparative perspective. *Exerc Sport Sci Rev.* 28(3):99-107, 2000.
7. Cipriani D, Abel B, Pirrwitz D. A comparison of two stretching protocols on hip range of motion: implications for total daily stretch duration. *J Strength Cond Res.* 17(2):274-8, 2003.
8. Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Oishi J, Salvini. TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* 37(12):1853-61, 2004.

9. Cox VM, Williams PE, Wright H, James RS, Gillott KL, Young IS, Goldspink DF. Growth induced by incremental static stretch in adult rabbit latissimus dorsi muscle. *Exp Physiol.* 85(2):193-202, 2000.
10. Davis DS, Ashby PE, McCale KL, McQuain JA, Wine JM. The effectiveness of 3 stretching techniques on hamstring flexibility using consistent stretching parameters. *J Strength Cond Res.* 19(1):27-32, 2005.
11. Dawes NJ, Cox VM, Park KS, Nga H, Goldspink DF. The induction of c-fos and c-jun in the stretched latissimus dorsi muscle of the rabbit: responses to duration, degree and re-application of the stretch stimulus. *Exp Physiol.* 81(3):329-39, 1996.
12. Friden J, Lieber RL. Physiologic consequences of surgical lengthening of extensor carpi radialis brevis muscle-tendon junction for tennis elbow. *J Hand Surg.* 19(2):269-74, 1994.
13. Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol.* 5(2):87-90, 2003.
14. Goldspink DF, Cox VM, Smith SK, Eaves LA, Osbaldeston NJ, Lee DM, Mantle D. Muscle growth in response to mechanical stimuli. *Am J Physiol.* 268(2 Pt):E288-97, 1995.
15. Goldspink DF. The influence of denervation and stretch on the size and protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol.* 269(1):87P-88P, 1977.
16. Gomes AR, Coutinho EL, Franca 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.* 37(10):1473-80, 2004.

17. Holly RG, Barnett JG, Ashmore CR, Taylor RG, Mole PA. Stretch-induced growth in chicken wing muscles: a new model of stretch hypertrophy. *Am J Physiol.* 238(1):C62-71, 1980.
18. Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Tanaka N. Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 84(3):419-23, 2003.
19. Jaspers RT, Brunner R, Pel JJ, Huijing PA. Acute effects of intramuscular aponeurotomy on rat gastrocnemius medialis: force transmission, muscle force and sarcomere length. *J Biomech.* 32(1):71-9, 1999.
20. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 84(2):649-98, 2004.
21. Koh TJ, Tidball JG. Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *Physiol.* 15;519 Pt 1:189-96, 1999.
22. kim, Y-J, Sah RLY, Grodzinsky AJ, Plaas, AHK, Sandy JD. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior; Physical stimuli. *Arch Bioch Bioph.* 311(1): 1-12, 1994.
23. Lieber RL, Ljung BO, Friden J. Intraoperative sarcomere length measurements reveal differential design of human wrist extensor muscles. *J Exp Biol.* 200(Pt1):19-25, 1997.
24. Low SY, Taylor PM Integrin and cytoskeletal involvement in signalling cell volume changes to glutamine transport in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 15;512 (Pt 2):481-5, 1998.

25. Malliaropoulos N, Papalexandris S, Papalada A, Papacostas E. The role of stretching in rehabilitation of hamstring injuries: 80 athletes follow-up. *Med Sci Sports Exerc.* 36(5):756-9, 2004.
26. Martineau LC, Gardiner PF. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. *J Appl Physiol.* 91(2):693-702, 2001.
27. McNair PJ, Stanley SN. Effect of passive stretching and jogging on the series elastic muscle stiffness and range of motion of the ankle joint. *Br J Sports Med,* 30(4):313-7, 1996.
28. Michna H. Morphometric analysis of loading-induced changes in collagen-fibril populations in young tendons. *Cell Tissue Res.* 236(2):465-70, 1984.
29. Reid DA, McNair PJ. Passive force, angle, and stiffness changes after stretching of hamstring muscles. *Med Sci Sports Exerc.* 36(11):1944-8, 2004.
30. Salvini TF, Morini CC, Araujo HSS & Ownby CH. Long-term regeneration of fast and slow murine skeletal muscles after induced injury by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Broad-Banded Copperhead) venom. *Anatomical Record.* 254: 521-533, 1999.
31. Shah SB, Peters D, Jordan KA, Milner DJ, Friden J, Capetanaki Y, Lieber RL. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Bio.* 204 (Pt10):1703-10, 2001.
32. Starring DT, Gossman MR, Nicholson GG Jr, Lemons J. Comparison of cyclic and sustained passive stretching using a mechanical device to increase resting length of hamstring muscles. *Phys Ther.* 68(3):314-20, 1988.

33. Stauber WT, Miller GR, Grimmett JG, Knack KK. Adaptation of rat soleus muscles to 4 wk of intermittent strain. *J Appl Physiol.* 77(1):58-62, 1994.
34. 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.* 224(1):231-44, 1972.
35. Tamai K, Kurokawa T & Matsubara I In situ observation of adjustment of sarcomere length in skeletal muscle under sustained stretch. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi. Journal of the Japanese Orthopaedic Association.* 63:1558-1563, 1989.
36. Tammi M, Saamanen AM, Jauhiainen A, Malminen O, Kiviranta I, Helminen H. Proteoglycan alterations in rabbit knee articular cartilage following physical exercise and immobilization. *Connect Tissue Res.* 11(1):45-55, 1983.
37. Trudel G, Uthoff HK, Brown M. Extent and direction of joint motion limitation after prolonged immobility: an experimental study in the rat. *Arch Phys Med Rehabil.* 80(12):1542-7, 1999.
38. Vidal BC, Mello ML, Pimentel ER. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. *Histochem J.* 14(6):857-78, 1982.
39. Vidal, BC. Evaluation on the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell. Mol. Biol.* 32:527-535, 1986.
40. Vilarta R, Vidal B.C. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix.* 9(1):55-61, 1989.

41. Williams PE & Goldspink G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. *Journal of Cell Science*. 9:751-767, 1971.
42. Williams P, Simpson H, Kyberd P, Kenwright J, Goldspink G. Effect of rate of distraction on loss of range of joint movement, muscle stiffness, and intramuscular connective tissue content during surgical limb-lengthening: a study in the rabbit. *Anat Rec*. 1;255(1):78-83, 1999.

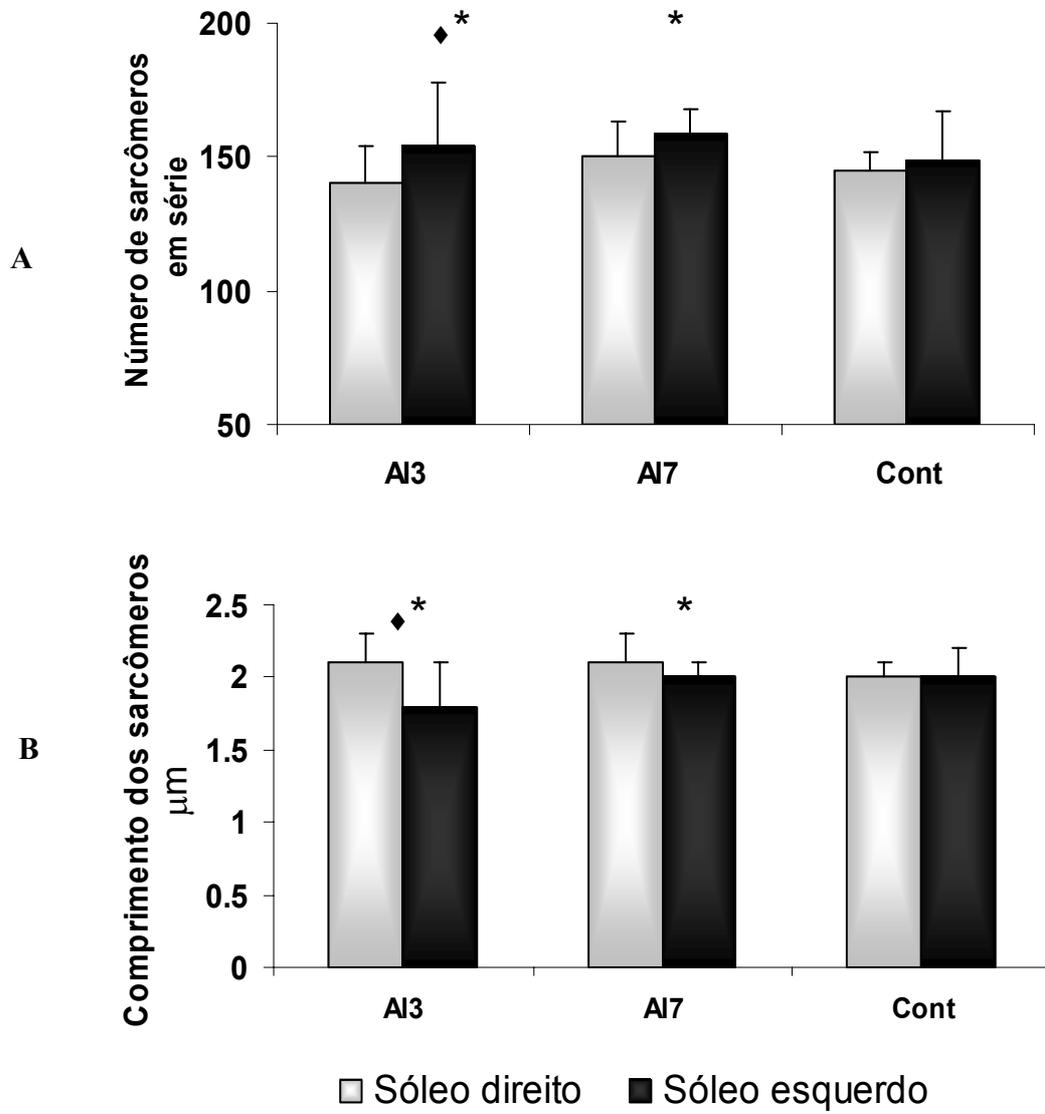


Figura 1

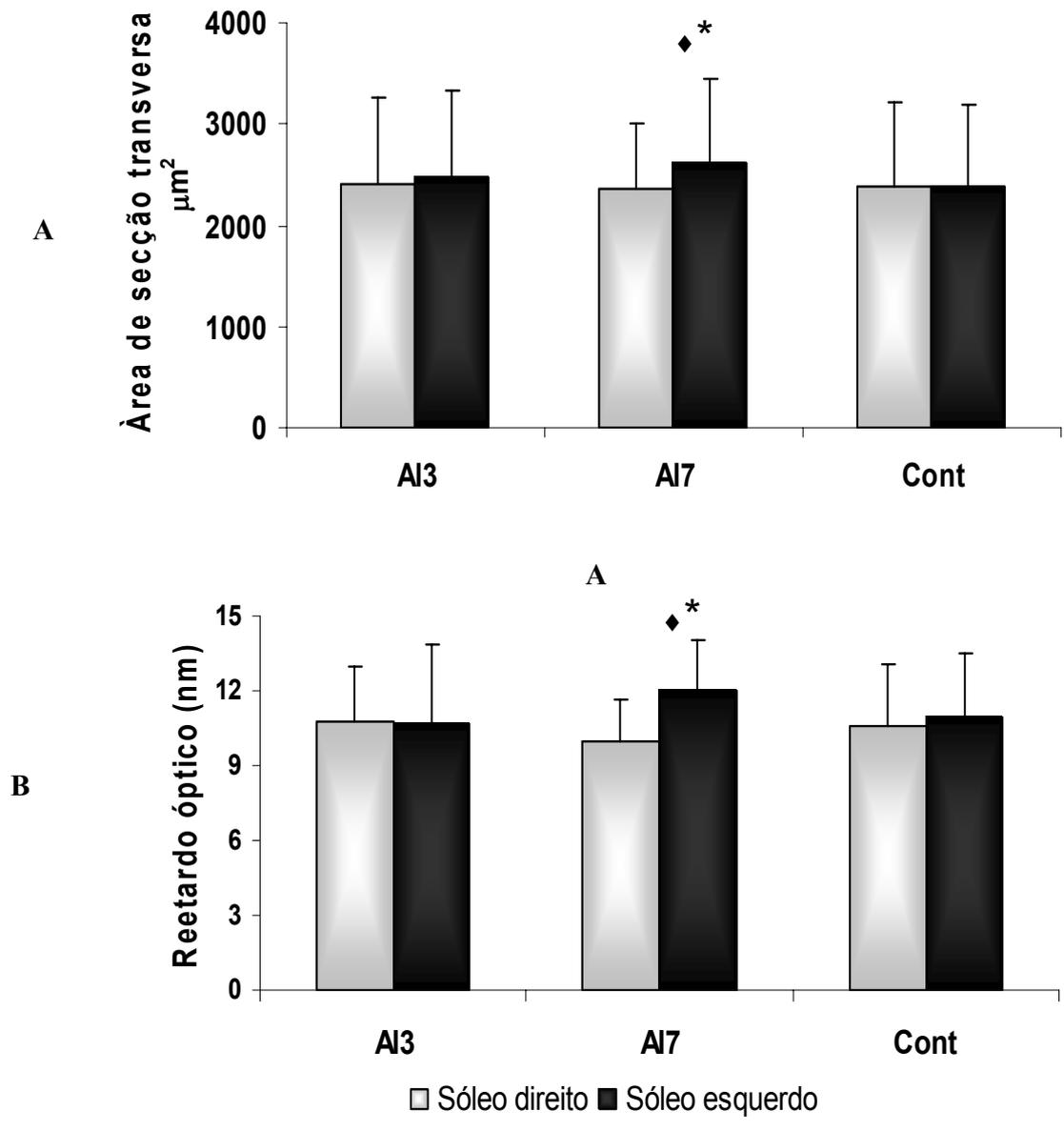


Figura 2

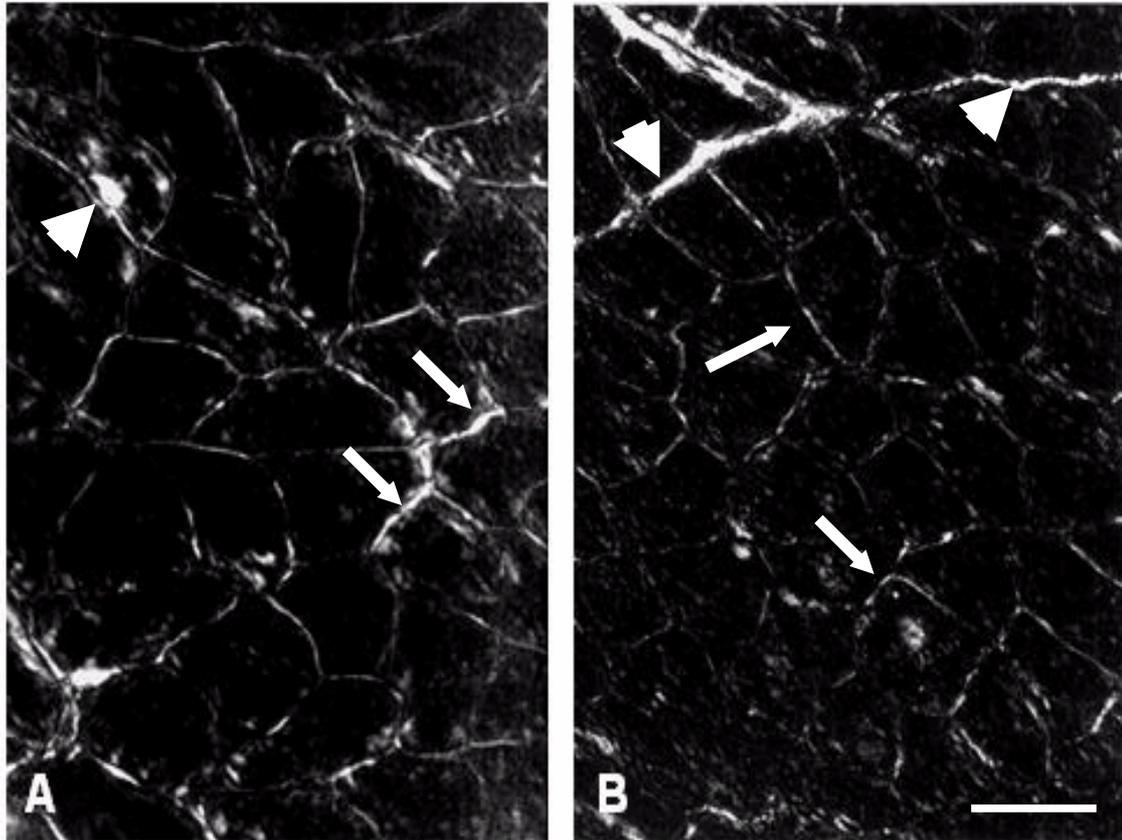


Figura 3

Listas de Figuras

Figura 1. Efeito do alongamento passivo no número (A) e comprimento dos sarcômeros em série (B). A13= músculo sóleo alongado três vezes por semana; A17= músculo sóleo alongado sete vezes por semana Cont= músculo sóleo sem nenhum procedimento. * $p < 0,01$ quando comparado com sóleo direito, \blacklozenge $p < 0,01$ quando comparado com o grupo A17 e Cont. Valores são em médias \pm desvio padrão.

Figura 2. Efeito do alongamento passivo na área de secção transversa das fibras musculares (A) e no retardo óptico da birrefringência das fibras de colágeno dos músculos sóleos (B). A13= músculo sóleo alongado três vezes por semana; A17= músculo sóleo alongado sete vezes por semana Cont= músculo sóleo sem nenhum procedimento. * $p < 0,01$ quando comparado com sóleo direito, \blacklozenge $p < 0,01$ quando comparado o grupo A13 e Cont. Valores são em médias \pm desvio padrão.

Figura 3. Corte histológico do músculo sóleo, sem coloração, observado sobre luz polarizada, posicionado a 45° do polarizador. A (A17): As fibras de colágeno do tecido conjuntivo intramuscular do perimísio (cabeça de seta) apresentam birrefringência intensa (maior brilho) e com fibras mais grossas no endomísio (setas). B (Cont): tecido conjuntivo intramuscular normal, com brilho uniforme menos intenso no endomísio (seta) e apresenta feixes de colágeno mais grossos no perimísio (cabeça de seta). Barras = $75 \mu\text{m}$.

Tabela 1. Peso corporal e peso e comprimento dos músculos sóleos.

Peso corporal (g)			
	Peso inicial	Peso final	Diferença relativa (%)
Al 3	344 ± 35	335±23	2,2±5,6♦
Al 7	356±21	360±22	1,3±2,1♦
Cont	367±16	421±27*	15±8,8
Peso muscular (g)			
	Sóleo direito	Sóleo esquerdo	Diferença relativa (%)
Al 3	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,02	4,8 ± 1,4
Al 7	0,19 ± 0,03	0,23 ± 0,04 †	16,7 ± 4,5♣
Cont	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02	-1,7 ± 2,3
Comprimento muscular (mm)			
	Sóleo direito	Sóleo esquerdo	Diferença relativa (%)
Al 3	20,3±1,4	22,2±0,4 †	10,1±5,6♠
Al 7	21,0±0,5	22,2±0,4 †	7,0±2,7
Cont	21,0±1,1	21,0±1,1	0±0

Valores são em médias ± desvio padrão

Al3= músculo sóleo alongado três vezes por semana, Al7= músculo sóleo alongado, sete vezes por semana, Cont= músculo sóleo sem nenhum procedimento. * P<0,01 quando comparado com o peso corporal inicial; † P<0,05 quando comparado com o sóleo direito contralateral; ♦ P<0,05 quando comparado a diferença relativa do grupo Cont; ♣ P<0,01 quando comparado a diferença relativa do grupo AL3 e Cont; ♠ P<0,01 quando comparado a diferença relativa do grupo AL7 e Cont.

Tabela 2: Valores de retardos ópticos (ROs) das birrefringências das fibras de colágeno do tecido conjuntivo dos músculos sóleos. Meio de embebição H₂O com Índice de refração 1,333

Grupos	Sóleo direito	Sóleo esquerdo	Diferença relativa (%)
A13	10,6±3,2	10,8±2,2	3,8±0,9
A17	9,9±1,6	11,9±2,1*	9,8±2,1♦
Cont	12,5±2,5	12,9±2,6	2,7±0,5

Valores são em médias ± desvio padrão

A13= músculo sóleo alongado três vezes por semana; A17= músculo sóleo alongado sete vezes por semana; Cont= músculo sóleo sem nenhum procedimento. * p<0,01 quando comparado com o sóleo direito; ♦ p<0,01 quando comparado com o grupo A17 e Cont.

7- CONCLUSÃO GERAL

O alongamento passivo realizado de forma manual, por curto período de tempo, causou adaptações benéficas no tecido muscular e conjuntivo no músculo esquelético de ratos.

8- BIBLIOGRAFIA

- ALTER, M. J. Ciência da flexibilidade. 2ª ed. Artmed, Porto Alegre; 1999.
- BANNERMAN, B.H.S et al. Increase in soleus muscle length: A comparison between two stretching techniques. *NZ Journal of Physiotherapy*. 15-18, 1996.
- BOOTH, F. W. and KELSO, J. R. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 342: 231-238, 1973.
- BOOTH, F. W. Effects of limb immobilization on skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol*. 52(2): 1113-1118, 1982.
- BOOTH, F.W. Time of course of muscular atrophy during immobilization of hind limbs in rats. *J. Appl Physiol*. 43: 656-661, 1977.
- CAMPIONE, M., AUSONI, S., GUEZENNEC, C. Y. and SCHIAFFINO, S. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hind limb suspension. *J. Appl Physiol*. 74: 1156-1160, 1993.
- CARPENTER, S. and KARPATI, G. Pathology of skeletal muscle. New York, Edinburgh, London, Melbourne, Churchill Livingstone, 1984.
- DEYNE, P.G. Application of passive stretch and its implications for muscle fibres. *Physical Therapy*. 81(2): 819-827, 2001.
- DIFEE, G. M., CAIOZZO, V. J., HERRICK, R. E. and BALDWIN, K. M. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hind limb suspension. *Am J. Physiol*. 260: 528-534.

- FELAND, J. B. et al. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. *Physical Therapy*. 81(5): 1111-1117, 2001.
- FITTS, R. H., METZGER, J. M., RILEY, D. A. AND UNSWORTH B. R. Models of disuse: a comparison of hind limb suspension and immobilization. *J. Appl. Physiol*. 60(6): 1946-1953, 1986.
- FRIDÉN, J. and LIEBER, R. L. Physiological consequences of surgical lengthening of extensor carpi radialis brevis muscle-tendon junction for tennis elbow. *J. Hand Surg*. 19A: 269-274.
- GAJDOSIK, R.L. Passive extensibility of skeletal muscle: Review of the literature with clinical implications. *Clinical Biomechanics*. 16: 87-101, 2001.
- GAMRIN, L. et al. The effect of unloading protein synthesis in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 163: 369-377, 1998.
- GORDON, A. M., HUXLEY, A. F. and JULIAN, F. J. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibers. *J. Physiol*. 184: 170-192, 1966.
- GUYTON, A. C. *Fisiologia Humana*. 6^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 1988.
- HALBERTSMA, J. P. K., BOLHUIS, A. I. V., GOEKEN, L. N. H. *Arch Phys Med Rehabil*. 77: 688-692, 1996.
- HAMEED, M., HARRIDGE, S. D. R., GOLDSPINK, G. Sarcopenia and hypertrophy: A role for insulin-like growth factor-1 in aged muscle? *Exercise and Sport Science Reviews*. 30(1): 15-19, 2002.

- HERBERT, R. D., BALNAVE, R. J. The effect of position of immobilization on resting length, resting stiffness, and weight of the soleus muscle of the rabbit. *Journal of Orthopaedic Research Society* 11: 358-366, 1993.
- KANNUS, P., et al. Free mobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 84(4): 1418-1424, 1998.
- KARPAKKA, J. et al. The effects of preimmobilization training and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle. *Inst. J. sports Med.* 11: 484-488, 1990.
- KEMKOVÁ, H. et al. Immobilization atrophy and membrane properties in rat skeletal muscle fibres. *Pflugers Arch.* 416: 126-129, 1990.
- KIM, D.H., WITZMANN, F.A. and FITTIS, R. H. Effect of disuse on sarcoplasmic reticulum in fast and slow skeletal muscle. *Am J. Physiol.* 243: 15-16, 1982.
- KOH, T.J. Do adaptations in serial sarcomere number occur with strength training? *Human Movement Science.* 14: 61077, 1995.
- LIEBER, R.L. *Skeletal muscle structure and function: implications for rehabilitation and sports medicine.* Williams & Wilkins, United States of America; 1992.
- LIEBER, R. L., LOREN, G.J. and FRIDÉN J. In vivo measurement of human wrist extensor muscle sarcomere length changes. *Journal of Neurophysiology.* 17(3): 874-881, 1994.
- LIEBER, R. L., JUNG, B. and FRIDÉN, J. Intraoperative sarcomere length measurements reveal differential design of human wrist extensor muscle. *The Journal of Experimental Biology.* 200: 19-25, 1997.

- MADDING, S. W. et al. Effects of duration of passive stretch on hip abduction range of motion. *Journal of Orthopaedic Sports Physical Therapy*. 8(8): 409-416, 1987.
- MATANO, T., TAMAI, K. and KUROKAVA, T. Adaptation of skeletal muscle in limb lengthening: A light diffraction study on the sarcomere length in situ. *Journal of Orthopaedic Research*. 12: 193-196, 1994.
- MINAMOTO, V. B. and SALVINI, T. F. O músculo como um órgão de secreção hormonal regulador pelo estímulo mecânico. *Rev. bras. Fisioter*. 5 (2): 87-94, 2001.
- NORKIN, C.C., WHITE, D.J. *Measurement of joint motion: A guide to goniometry*. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Fa Davis Co; 1995.
- RUSSEL, B., DIX, D. J., HALLER, D. L., JACOBS-EL, J. Repair of injured skeletal muscle: A molecular approach. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 24(2): 189-196, 1992.
- SALVINI, T. F. Plasticidade e adaptação postural dos músculos esqueléticos. IN: Marques, A. P. *Cadeias musculares: um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global*. Manole, São Paulo; 2000.
- SCHMALBRUCH, H. Muscle fibre splitting and regeneration in diseased human muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2: 3-19, 1976.
- SHAFFER, M. A., et al. Effects of immobilization on plantar-flexion torque, fatigue resistance, and functional ability following an ankle fracture. *Physical Therapy*. 80(8): 1-16, 2000.

- SIMPSON, D. G. et al. Role of mechanical stimulation in the establishment and maintenance of muscle cell differentiation. *International Review of Cytology*. 150: 69-94, 1994.
- SMITH, C. A. The warm-up procedure: To stretch or not to stretch. A brief review. *Journal of Orthopaedic Sports Physical Therapy*. 19(1): 12-17, 1994.
- SMITH, L. K. et al. *Cinesiologia clínica de Brunnstrom*. 5ª ed. Manole; 1997.
- WANG, K. et al. Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: A test of the segmental extension model of resting tension. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*. 88(6): 7101-7105, 1991.
- WERNING, A., SALVINI, T.F. and IRINTCHEV, A. Axonal sprouting and changes in fibre types after running-induced muscle damage. *J. Neurocytol.* 20: 903-913, 1991.
- WILLIAMS, P. E. Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 47: 1014-1016, 1988.
- WILLIAMS, P. E. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilized muscle. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 49: 316-317, 1990.
- WILLIAMS, P. E., GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *J. Anat.* 127: 459-468, 1978.
- WILLIAMS, P. E., GOLDSPINK, G. The effects of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. *J. Anat.* 116: 45-65, 1973.
- WILLIAMS, P.E., CATANESE, T., LUCEY, E.C. and GOLDSPINK, G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J. Anat.* 158: 109-114, 1988.

- WILLIAMS, P.E., GOLDSPINK, G. Connective tissue changes immobilized muscle. *J. Anat.* 138 (2): 343-350, 1984.
- WILLIAMS, P.E., GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J. Anat.* 138(2): 343-350, 1984.
- WILLIAMS, P.E., GOLDSPINK, G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J. Anat.* 158: 109-114, 1988.
- ZEMKOVÁ, H. et al. Immobilization atrophy and membrane properties in rat skeletal. *Pflugers Arch.* 416: 126-129, 1990.
- DIX, D.J. & EISENBERG, B. R. Redistribution of myosin heavy chain mRNA in the midregion of muscle fibers. *Cell Tissue Res.* 263: 61-69, 1991.
- GOLDSPINK, D. F. et al. Muscle growth in response to mechanical stimuli. *Am. Physiol.* 264: 288-297, 1995.
- SCHMALBRUCH, H. Regeneration muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: a serial section study. *Neurol.* 34: 60-65, 1984.
- YANG, S. Y. ALNAQEEB, M., SIMPSON, H. & GOLDSPINK, G. Changes in muscle fiber type, muscle mass and IGF gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. *J Anat.* 190: 613-622, 1997.
- BOOTH, F. W. and KELSO, J. R. Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *Journal of Applied Physiology.* 34(3): 404-496, 1973.
- GODSPINK, G. Muscle growth and muscle function: a molecular biological perspective. *Res. Vet. Sci.* 60 (30): 193-204, 1996.

- WILLIAMS, P. E. and GOLDSPIK, G. Connective tissue in immobilised muscle. J. Anat. 138(2): 343-350, 1984.
- GOLDSPIK, G., TABARY, C., TABARY, J.C., TARDIEU, C., TARDIEU, G. Effect of denervation on the adaptation of sarcomere number and muscle extensibility to the function length of the muscle. J. Physiol. 42: 236-733, 1974.
- BOYES, G. & JOHNSTON, I. Muscle fibre composition of rat vastus intermedius following immobilisation at different muscle length. Pflug Arch. 381: 195-2000.
- WANG, K. Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle. Cell and muscle motility. In J. W. Shay; New York: Plenum .Vol. 6: 315-369, 1985.
- MATANO, T., TAMAI, K. and KUROKAWA, T. Adaptation of skeletal muscle in limb lengthening: a light diffraction study on the sarcomere length *in situ*. Orthopaedic Research Society. 12: 193-196, 1994.
- JARVINEN, M. Immobilization effects on the tensile properties of striated muscle: Na experimental study in the rat. Arch Phys Med Rehabil. 58: 123-127, 1977.
- GOLDSPIK, G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 120: 5-15, 1999.
- STOLOV, W. C., RIDDELL, W. M., SHRIER, K. P. Effects of electrical stimulation on contraction of immobilized, innervated and denervated muscle (Abstract). Arch Phys Med Rehabil. 52: 589, 1971.
- TAMKUN, J. W. et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. Cell. 46(2): 271-282, 1986.

BLAU, H. How fixed is the differentiated state? Lessons from heterokaryons. Trends in Genetics. 58 (8): 268-272, 1989.

BANDY, W. D., IRION, J. M. The effects of time on static stretch on the flexibility of the hamstring muscle. Phys Ther. 74: 845-852, 1994.

SMITH, L. A.K. et al. Cinesiologia clínica de Brunnstrom. 5ª ed. Manole, 1997.

Decreased muscle extensibility and reduction of sarcomere of sarcomere number in soleus muscle following local injection of tetanus toxin. J. Neurol Sci. 40: 123-131, 1979.

8- Anexos

8.1- Artigo Submetido

Research article submitted to Connective Tissue Research

Bouts of Passive Stretching after Immobilization of the Rat Soleus Muscle Increases the Collagen Macromolecular Organization and Muscle Fiber Area

Eliane Lima Coutinho¹, Camila DeLuca¹, Benedito Campos Vidal², Tania Fatima Salvini¹

¹Unit of Skeletal Muscle Plasticity, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos - UFSCAR, São Carlos, SP, Brazil.

²Institute of Biology, Department of Cell Biology, Campinas State University - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Address for correspondence: Tania F. Salvini. Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos. CEP 13565-905 - São Carlos, SP. Brasil. Phone: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. E-mail address: tania@power.ufscar.br

Key Words: Connective tissue, Muscle Atrophy, Hypertrophy, Stretch, Rehabilitation, Immobilization.

Running title: Bouts Stretch in the Skeletal Muscle.

Article Type: Original Research

ABSTRACT

This study evaluated the effect of short bouts of stretching in the soleus muscle after immobilization, through the birefringence of the intramuscular connective tissue (ICT) and the muscle fiber area. Thirty rats were divided into five groups: 1) the left soleus was immobilized in the shortened position; 2) after immobilization the animals remained free; 3) after immobilization, the soleus was daily stretched (10 stretches of 60 s with 30 s rest); 4) after immobilization, the soleus was stretched 3 times a week; 5) control. The immobilization caused lost of birefringence of ICT and of muscle fiber area, while only daily stretch increased both compared to control ($P < 0,05$). In conclusion, daily short bouts of stretch after immobilization induced the molecular reorganization of collagen bundles and the muscle fibers hypertrophy in the rat soleus.

INTRODUCTION

Although the effect of the stretch in skeletal muscle had been largely investigated, the mechanical influence of the short time passive stretch, ordinarily used in rehabilitation, for the recovery of trophism and of the connective tissue of the skeletal muscle after periods of immobilization, has not been studied in details. On the other hand, the deleterious consequences of the immobilization, such as loss of serial sarcomeres (1-5), proliferation of the connective tissue and diminution of the cross-section area of muscle fibers (1,12) have been largely studied, due to the fact that the immobilization is a frequently used method for the treatment of various affection types of the skeletal muscle system (6-9).

After the immobilization, with the muscle in the short position, the muscular atrophy and the proliferation of the connective tissue are considered the most important muscular adaptations. Both alterations are caused by disequilibrium between the synthesis and degradation of the muscular and collagen proteins (10). Studies show that the normal collagen remodeling is of only 1.3% a day in muscles of rats, while the synthesis rate of muscular proteins is 11.8%. This way, during the immobilization, a higher loss of muscular proteins occurs with a proportional increase in the disorganized intramuscular connective tissue (ICT), reducing the flexibility of the muscular tissue and the cross-section area (CSA) of the muscular fibers (11,12), resulting in a smaller functional capability.

On the other hand, the muscular stretching exercise is known as a powerful stimulus to smooth the atrophy and to induce the muscular hypertrophy (4,5,13,14). A recent study showed that stretch bouts applied to the soleus muscle of a rat 3 times a week, during 40 minutes, increased the number of serial sarcomeres and the cross-section area (4). Other studies have also identified the beneficial effect of the muscular stretching for the remodeling and reorganization of collagen fibers of the ICT (1,14).

Although previous studies demonstrate that the macromolecular reorganization of the collagen fibers in the muscle, tendon, bone and cartilage can be evaluated through birefringence measures, using polarized light microscopy (15-20), few works have been investigating the macromolecular organization of the ICT after immobilization periods,

using the analysis of birefringence (20,21), which is considered an accurate morphological evaluation technique. In addition, no studies evaluated the macromolecular organization of the intramuscular collagen during short bouts of stretch, frequently used for muscular rehabilitation.

The birefringence measures are fundamental to investigate the alterations in the macromolecular orientation of the collagen fibers during development, repair, aging and adaptation after exercise (22).

The evaluation of the organization of collagen bundles is done through the total birefringence measures, which is the sum of the form or textural birefringence and the intrinsic birefringence (23,24). The form birefringence is dependent on the geometry, the partial volumes (concentration), aggregation state and orientation of the collagen bundles, while the intrinsic birefringence is determined by the orientation of all the electron transitions in the molecules (23,24). Thus, this is an important tool to determine the direction of the vibrations and, consequently, muscular orientation of the collagen fibers of the (20,22,25), informing the macromolecular alterations of the intramuscular connective tissue associated to the muscular immobilization and stretching.

Although the studies reported here provided an important contribution to knowledge about the effect of stretching on the trophism of skeletal muscle and connective tissue organization, most of them used long periods of muscle stretching, not normally used with humans during rehabilitation or sports activities. It is also difficult for humans to maintain long periods of muscle stretching. On the other hand, short bouts of muscle stretching (30 s or 1 min) have been recommended to treat shortened human muscles because of their effectiveness in improving the joint range of motion and flexibility (26,27). Although sessions of short stretching periods are recommended, safe and effective for humans, the effects of this procedure on skeletal muscle have not yet been evaluated in detail, which could be carried out using animal models.

Although various studies have already shown the influence of the muscular immobilization and of the long duration muscular stretching of the intramuscular connective tissue and in the cross-section area (1,3,28,29), this is the first study using polarized light microscopy analysis and morphology that evaluated the effect of short duration passive stretching, using a stretching protocol similar to the one used in rehabilitation, through the analysis of the macromolecular organization of the collagen fibers of the connective tissue and of the cross-section area of previously immobilized muscles.

Our hypothesis in this study was that short bouts of stretch are effective to cause improvement in both muscle fibers and connective tissue after immobilization. For this purpose, the effect of 10 manual passive stretching bouts of 60 s, with 30 s of rest in between each stretching section, 7 and 3 times a week on the soleus muscle after immobilization was analyzed.

Due to ethical restrictions several aspects difficult the studies about human muscle and connective tissue adaptation submitted to stretch. Thus, although this study used animal model, it provided new information about the influence of manual passive stretching on the organization of the connective tissue and on the trophism of skeletal muscle fibers, previously immobilized.

MATERIALS AND METHODS

Animal care and experimental groups

Thirty 18-week-old male Wistar rats were used (weight 356 ± 11 g). They were housed in plastic cages in a room with controlled environmental conditions and had free access to water and standard food. The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (95 mg/kg) for the stretching of the soleus muscle and the muscle dissection. Afterwards, they were killed by an overdose of the anesthetic. The Ethical Committee for Animals in Experiments of the University approved this study, which was developed in accordance to the policy statement in relation to the declaration of Helsinki.

The animals were randomly divided into five groups of six rats each one: a) *Immobilized (I)*: the left soleus muscle was immobilized for 4 weeks in the shortened position maintained by the full plantar flexion of the ankle, as previously described (4,5), and the muscle was evaluated immediately after the immobilization period; b) *Three weeks free after the Immobilization (I+3WFree)*: after the immobilization the animals remained free in the cages for 3 weeks and were not submitted to stretch; c) *Stretching 3 times a week after immobilization (I+3StW)*: after the 4 weeks of immobilization, the soleus muscle was passively stretched 3 times a week (on Mondays, Wednesdays and Fridays) for 3 weeks and evaluated after the last stretching bout; d) *Daily stretching after immobilization (I+DailySt)*: after the immobilization period, the soleus muscle was passively stretched daily during the following 3 weeks (10 one minute stretching bout with 30s of rest between each one) and evaluated after the last stretching session); e) *control (C)*: one group of animals was not submitted to any of the procedures and the soleus was evaluated after 7 weeks.

Immobilization

To keep the soleus muscle in the full shortened position the left ankle joint was fixed in full plantar flexion, as previously described (4,5). The immobilization device used is effective in producing chronic soleus muscle disuse and atrophy.

Stretching Procedure

To stretch the left soleus muscles, the left ankle was held in full dorsal flexion for 1 minute, performed manually, as proposed by Ikeda et al. (30). One session of passive stretch consisted of 10 stretching bouts, each one kept for 1 minute, with 30 seconds of rest intervals among each stretching bout. Bouts of passive stretch performed manually were chosen for this study because a similar procedure is effective to improve the flexibility in humans (31,32).

Muscle morphology

Seven weeks after the experiment, both the left and right soleus muscles of the animals were removed and weighted. Afterwards, the muscles were immediately frozen in isopentane pre-cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C in a freezer (Forma Scientific, USA). Serial cross-sections (10 µm) were obtained from the middle belly of the frozen muscles using a cryostat (Microm HE 505, Germany) and the histological cross-sections were stained with 1% Toluidine blue/1% Borax for the measurement of the muscle fiber cross-section area, as previously described (33).

The fiber muscle cross-sections (10µm) without coloration and imbibed in distilled water were used for the birefringence measures. Okita et al (34) showed, after 4 weeks of immobilization, that the muscle is affected by the shortening muscle fibers during the early stage of immobilization, after that the collagen adapts by the fibril arrangement in the endomysium and perimysium becoming more circumferential. Because these changes in the arrangement of collagen fibers the birefringence of connective can be better visualized by means of cross-sections of muscle fibers.

Polarizing Microscopy: Optical Retardation of Birefringence of Intramuscular Connective.

The analysis of the total birefringence of connective tissue is a highly reproducible technique for the detection of variations in the aggregation state and molecular order of

collagen bundles (22). The birefringence of the connective tissue of the soleus muscle (endomysium and perimysium) was measured through the optical retardation that determines the molecular aggregation state of the collagen. This analysis was carried out with polarization light microscopy.

The measurements of the optical retardation (OR) were made in a Zeiss polarized light microscope equipped with a x10 objective, monochromatic light (546 nm) and Sénarmont ($\lambda/4$) Compensators. A 10 μm thick section of the soleus muscle from each animal was measured, the section been imbibed for 30 minutes in water ($n_D= 1.333$) (36).

One hundred OR measurements were made at different points of each soleus muscle section (endomysium and perimysium) under consideration in each imbibing medium, thus allowing the heterogeneity of distribution of the collagen bundles within each muscle.

It is known that 45° , in relation to the plane polarized light (PPL), collagen fibers show the biggest brightness of birefringence and consequently a high value of RO. This occurs because the majority of the collagen fibers are guided along the muscle fibers axis. Thus, the measurements of the Ors measurements have been made orienting the collagens fibers to 45° (Figure 1).

Muscle fiber area

The cross-sectional area of one hundred muscle fibers was measured using a light microscope (AxioLab, Carl Zeiss, Germany) and software for morphology (Axiovision 3.0.6 SP4, Carl Zeiss, Germany). The muscle fibers were randomly chosen from the central region of a cross-section of each soleus muscle stained by Toluidine blue.

Statistical analysis

The paired Student *t*-test was used to compare the data for the right and left soleus muscle of the same animals within each group. Possible differences among groups were determined by ANOVA and by the Duncan test, with level of significance set at 5% ($P < 0.05$).

RESULTS

Optical Retardation of Birefringence

The birefringence measured in connective tissue of soleus muscle after immobilization exhibited lower ORs values. The immobilized muscles during 4 weeks lost $25.7 \pm 1.7\%$ of the OR of the collagen birefringence compared to the contra lateral soleus (11.9 ± 3.7 vs 16.1 ± 4.5 nm, respectively, $P < 0.05$) and were statistically different from the control group. The soleus muscles I+3WFree and I+3StW recovered the ORs compared to the contra lateral soleus (11.2 ± 2.1 vs 11.4 ± 1.8 nm and 10.7 ± 2.1 vs 10.5 ± 2.5 nm, respectively) and control group. On the other hand, the soleus muscle stretched 7 times increased $13.8 \pm 5.4\%$ the ORs compared to the contra lateral soleus (12.4 ± 2.2 vs 10.1 ± 2.4 nm, respectively, $P < 0.05$; Figure 2A), and was also different from the control group ($P < 0.05$)

The comparison of percentile differences of the ORs of the right and left soleus muscles of all groups among themselves showed that the control group ($2.7 \pm 0.9\%$) was different from all the groups ($P < 0.05$). The group stretched 7 times per week increased $13.8 \pm 5.4\%$ and was different from the immobilized (lost $25 \pm 1.7\%$). The immobilized and free for 3 weeks, and the immobilized and stretched 3 times groups did not show significant alterations ($1.8 \pm 0.8\%$ and $1.9 \pm 1.7\%$, respectively; $P < 0.05$).

Average values of the ORs of the birefringence of fibers collagen presented high correlation with the average of the cross-section area of fibers values treated passive stretch ($p < 0.05$, $r = 0.99$; Figure 3).

Optical Retardation of Birefringence

The birefringence measured in connective tissue of the soleus muscle after immobilization exhibited lower OR values. The I+3WFree and I+3StW soleus muscles recovered the ORs compared to the contra lateral soleus and the control group. On the other hand, the soleus muscle stretched 7 times a week increased the OR values compared to the contra lateral and was also different from the control group ($P < 0.05$) (Table 2).

Average values of the ORs of the birefringence of collagen fibers presented high correlation with the average of the cross-section area of muscle fibers values treated passive stretch ($p < 0.05$, $r = 0.99$; Figure 3).

Figure 4 shows the effect of the immobilization and the passive stretch in the birefringence (brightness) of collagen fibers of the intramuscular connective tissue. The control group presents strong birefringence in both perimysium and endomysium (4A). On the other hand, immobilization caused a strong reduction of the birefringence in collagen fibers (4B). However, the stretch applied 7 times per week caused strong increase of the birefringence and thickening of collagen bundles of the perimysium (4C). The immobilized and free group as well as the immobilized and stretched 3 times a week group were not different of the control.

Muscle Weight

Table 1 summarizes the results of the 4 week muscle immobilization and the effect of the stretch bouts after the soleus muscle immobilization of the rats. The weight was decreased after the 4 weeks of immobilization in short position. However, soleus muscle weight increased after passive stretch daily for 3 weeks, while immobilized and free soleus muscle weight and the muscle stretched 3 times a week after immobilization were statically unchanged.

Muscle Fiber Area

The soleus muscles immobilized in the shortened position for 4 weeks decrease the cross-sectional area of the muscle fibers compared to the contra lateral muscles (1179 ± 416 vs $2084 \pm 728 \mu\text{m}^2$, respectively, $P < 0.01$) and control group ($P < 0.01$), on the other hand, the soleus muscles immobilized and stretch 7 times increased cross-section area compared contra lateral soleus (2567 ± 814 vs $2333 \pm 849 \mu\text{m}^2$, respectively, $P < 0.01$) and control ($P < 0.01$). The soleus muscles immobilized and stretched 3 times, as well as the immobilized and free recovered the cross-section area compared to the contra lateral soleus

(2349 ± 1089 vs $2353 \pm 948 \mu\text{m}^2$ and 2151 ± 599 vs $2169 \pm 565\mu\text{m}^2$, respectively), although there has been a different control (Figure 2B).

The comparison of the percentile differences of all the 5 groups revealed that the group control, which did not modify the cross-section area of the right soleus compared to the contra lateral soleus ($0.01 \pm 0.006\%$), was different from the immobilized groups that decreased $37 \pm 10\%$ ($P < 0.01$) from the immobilized and free groups that did not present differences ($0.83 \pm 0.1\%$), from the immobilized and stretched 3 times that did not present difference ($0.17 \pm 0.05\%$) and of the group immobilized and stretched 7 times that presented an increase $10 \pm 2\%$ ($P < 0.01$). On the other hand, the group stretched 7 times that increased $10 \pm 2.1\%$ was also different from all the other groups ($P < 0.01$).

DISCUSSION

The results of this study demonstrated that 10 daily sessions of passive stretch caused increase of the cross-section area of the muscle fibers and a bigger macromolecular reorganization of collagen bundles of the ICT in the soleus muscle of the rat, previously immobilized in shortened position. However, the 3 times a week stretching did not cause this benefit. For our knowledge this is the first study that evaluated the effect of sessions of stretch carried passively, and for short periods in animal model, similar to the used and recommended for flexibility recovery during human rehabilitation.

Birefringence ROs of Intramuscular Connective Tissue (ICT)

In the present study four weeks of immobilization caused significant reduction in the birefringence collagen fibers. Previous studies have demonstrated that the loss of birefringence occurs due to disorganization of collagen fibers after immobilization (20). The reduction of the birefringence occurs due to the reduction of the state of aggregation of collagen bundles causing loss of the crystalline characteristics and the orientation of collagen molecules (23). Thus, our results indicate that immobilization decreased the aggregation state of collagen bundles in the skeletal muscle of the rat, immobilized in shortening position.

It was also interesting to observe that the free activity of the animal during three weeks in the cage, after release of immobilization, was able to stimulate the macromolecular reorganization of collagen fibers. In accordance to Vilarta and Vidal (22) during the animal walking, the collagens bundles are submitted to tensile strengths enough to stimulate mechanically the collagen reorganization.

It was interesting to verify that the birefringence of the soleus muscles immobilized and submitted to 10 stretching repetitions of 60 s each, 3 times a week, often the frequency used in the rehabilitation, was not better than the birefringence of the soleus muscles of the free animals after immobilization. On the other hand, the stretch exercise 7 times a week increased the macromolecular reorganization of collagen fibers compared to all other

groups. These results demonstrate that the turnover and arrangement of the collagen of the connective tissue of atrophied muscles depend on such of stretch time as of the stimulation frequency. These conclusions are based on the values of optic retardation of the total birefringence (textural + intrinsic) of collagen fibers of the endomysium and perimysium of the soleus muscles.

A study of Vilarta and Vidal (22) showed that the increase of the birefringence of collagen fibers is due to the increase of the form birefringence, indicating that the collagen fibers adaptation process to the muscle stretch is the result of the extracellular matrix (EM) reorganization. According to Oakes et al. (36), Michna (37), this corresponds to collagen bundles with more aligned fibrils and with more intense molecular packing conditions. Thus, the results of this study indicate that cause for the increasing of the total birefringence of ICT collagen fibers after daily stretching can be due to the increase of the form birefringence, in consequence to a higher macromolecular reorganization and collagens fibers birefringence.

Morphology

The morphologic analysis under polarized light microscopy made it possible to observe variations in the birefringence brightness intensity of the ICT due to the increase of tension in collagen fibers caused by passive stretch exercise carried 7 times a week. This interpretation is in accordance to the biophysics phenomena of fibers collagen, when submitted to mechanical tensions, observed in the studies of Oakes et al (36) and Michna (37). Thus, the results of this study suggest that control mechanism of the state of oriented aggregation of collagen fibers of skeletal muscle can be influenced by the duration of the stretching as well as to the mechanical stimulation frequency during passive stretch.

The contribution of this study is the presentation of new information on the skeletal muscle adaptation when submitted to immobilization and stretching, using the birefringence analysis that is an accurate methodology, which comes to add to the methods already existing of organization and quantification evaluation of the ICT described in previous studies (3,7,20,38-40).

Cross Section Area of Muscle Fiber (CSA)

An interesting comment from this study is that manual passive stretch 3 times a week, frequently used in the rehabilitation for flexibility gain after immobilization (26,31,41,42) did not produce additional gain compared to the free activity in the cage. On the other hand, the manual passive stretch 7 times a week increased the cross-section area in about 10% in relation to the contra lateral soleus. These results show that the muscle fibers area was frequency dependent, or either, 10 minutes of passive stretching bouts carried daily were more effective to muscle fiber hypertrophy, while 3 times did not cause any effect.

This hypertrophic effect of the stretch exercise was also found in others studies (43,44,45) that showed the increase in the muscular mass and cross-section of muscle fibers after passive stretch. However, none of these studies used protocols of passive stretching bouts, considering the parameters of duration and frequency often used in the rehabilitation (27,41,48). According to Glass (48) this hypertrophy occurs as a result of the addition of contract filaments in myofibril, increasing the CSA and also the muscle strength ratios.

After four weeks of immobilization a reduction of 37% of the cross-section area of soleus muscle fibers was observed. This atrophic response of the skeletal muscle due to the disuse is well known and described in a great number of human and animals studies (1,3,48,49-54).

On the other hand, the recovery of the CSA of fibers of the immobilized muscle and later kept free for 3 weeks in the cage, was probably due to tensile strength caused by the body weight discharge on the soleus muscle during the activity in the cage, thus stimulating the protein synthesis, as already described in others studies (3,52,55).

The methodology used in this study does not allow the identification of the associated mechanism with the increase of the AST of muscle fibers in the daily stretched group, however, it has been considered that mechanical sensors that bind the extracellular matrix to the cytoskeletal (56,57) can function as transducers of stretch mechanical signal, regulating the genic expression of muscular cells which could be activated by the stimulation frequency (58). Probably the daily stretching was more efficient in the activation of these mechanical sensors involved in the hypertrophy process of that stimulus applied in a lesser frequency.

It has already been described in the literature that the pathway of the PI3K/AKT (a serine-threonine kinase) involved in the hypertrophy regulation is activated by stretching (48). However, it is still unknown which of the stimulus is necessary to activate this pathway. An interesting study carried by Ikeda et al (45), in soleus muscles of rats showed that the passive stretching kept during 4 hours was more efficient than 2 hours to stimulate the myogenine expression, considered a myogenic factor of transcription of the hypertrophy. The authors concluded that a higher duration of the passive stretching is necessary to activate these myogenic factors. They suggest that if studies as this one could be applied in clinical situations, the passive stretching could be used to preserve or to increase the muscle strength. Other recent study (46) showed that 30 minute passive stretch daily sessions increased the genic expression of the Myo-D in soleus muscles of rats, a gene associate to hypertrophy. Based on both studies we could suggest that short stretch sections used daily can also have stimulated the expression of genes associated for the muscle hypertrophy. Other studies will be necessary to evaluate this hypothesis.

In conclusion the results of this study demonstrated that 10 daily sessions of passive stretch caused increase of the cross-section area of fibers muscle and bigger macromolecular reorganization of collagen bundles of the ICT in the soleus muscle of the rat, previously immobilized in shortened position. Despite the results been extracted from the skeletal muscle of rats, they indicate important adaptation associated to the muscle stretching, which are interesting for the rehabilitation area and sportive sciences.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Grant from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), São Paulo, Brasil. PhD and Undergraduate Fellowships were supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP, respectively (Brazilian agencies). The authors are grateful to Dr. Jorge Oishi for his helping in the statistic analysis. Tereza F. Piassi also provides us technical assistance and the process 2003/04597-0 (Vidal.BC).

REFERENCES

- 1- Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. (1988). The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat.* 158:109-14.
- 2- Goldspink DF. (1977). The influence of denervation and stretch on the size and protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol.* 269(1):87-88.
- 3- Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TL, Kvist M, Vieno T, Jarvinen TA, Natri A, Jarvinen M. (1998). Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol.* 84(4):1418-24.
- 4- Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Oishi J, Salvini TF. (2004). Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res* 37(12):1853-61.
- 5- Gomes AR, Coutinho EL, Franca CN, Polonio J, Salvini TF. (2004). Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* 37(10):1473-80.
- 6- Booth FW. (1978). Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization. *J Appl Physiol.* 44(2): 225-30.
- 7- Jozsa L, Kannus P, Thoring J, Reffy A, Jarvinen M, Kvist M. (1990). The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br.* 72(2):293-7.
- 8- Appell HJ. (1990). Muscular atrophy following immobilisation. A review. *Sports Med.* 10(1):42-58.

9- Kannus P, Parkkari J, Jarvinen TL, Jarvinen TA, Jarvinen M. (2003). Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. *Scand J Med Sci Sports*. 13(3):150-4.

10- Karpakka J, Vaananen K, Orava S, Takala TE. (1990). The effects of preimmobilization training and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle. *Int J Sports Med*. 11(6):484-8.

11- Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Takala TE. (2001). Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 172(2):131-40.

12- Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TE. (2003). Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 177(4):473-481.

13- Antonio J, Gonyea WJ. (1993). Progressive stretch overload of skeletal muscle results in hypertrophy before hyperplasia. *J Appl Physiol*. 75(3):1263-1271.

14- Goldspink G, Williams P, Simpson H. (2002). Gene expression in response to muscle stretch. *Clin rthop Relat Res*. (403 Suppl): S146-152.

15- Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. (1998). Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. *Plast Reconstr Surg*. 102(1): 124-131.

16- Vidal BC. (2003). Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron*. 34(8):423-32.

17- Pierce MC, Sheridan RL, Hyle Park B, Cense B, de Boer JF. (2004). Collagen denaturation can be quantified in burned human skin using polarization-sensitive optical coherence tomography. *Burns*. 30(6):511-517.

18- Vidal BC, Mello ML. (2005). Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye Ponceau SS to collagen fibers. *Biopolymers*. 78(3):121-128.

19- Traini T, Degidi M, Strocchi R, Caputi S, Piattelli A. (2005). Collagen fiber orientation near dental implants in human bone: Do their organization reflect differences in loading? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 74(1):538-546.

20- Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Jarvinen M. (2002). Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil*. 23(3):245-254.

21- Diamont J, Keller A, Baer E, Litt M and Arridge RGC. (1972). Collagen, ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc R. Soc. Lond. B*. 180:293-315.

22- Vilarta R, Vidal BC. (1989). Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*. 9(1):55-61.

23- Vidal BC. (1980). The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cellular & Molecular Biology*. 26:415-421.

24 - Vidal BC. (1986). Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell Mol. Bio.* 32:527-535.

25 - Vishniakov GN, Levin GG. (2002). Optic methods for measurements of muscle fiber birefringence. *Biofizika.* 47(4):711-715.

26- Bandy WD and Irion JM. (1994). The effects of time on static stretch on the flexibility of the hamstring muscle. *Phys Ther.* 74(9):845-852.

27- Bandy WD, Irion JM, Briggler M. (1997). The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. *Phys Ther.* 77(10):1090-1096.

28- Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TE. (2003). Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand.* 177(4):473-481.

29- Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, Majors AK, Scalise D, Delp MD. (2001). Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(5):R1710-1717.

30- Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Horinouchi K, Tanaka N. (2004). Induction of myogenin messenger ribonucleic acid in rat skeletal muscle after 1 hour of passive. Repetitive stretching. *Arch Phys Med Rehabil.* 85(1):166-167.

31- Worrell TW, Smith TL, Winegardner J. (1994). Effect of hamstring stretching on hamstring muscle performance. *J Orthop Sports Phys Ther.* 20(3):154-159.

32- Davis DS, Ashby PE, McCale KL, McQuain JA, Wine JM. (2005). The effectiveness of 3 stretching techniques on hamstring flexibility using consistent stretching parameters. *J Strength Cond Res* 19(1):27-32.

33- Salvini TF, Belluzzo SS, Selistre de Araújo HS, Souza DH. (2001). Regeneration and changes of muscle fiber types injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom. *Toxicon*. 39(5): 641-649.

34- Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Motomura M, Eguchi K. (2004). Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. *J Muscle Res Cell Motil.*;25(2):159-166.

35- Vidal BC, Mello ML, Godo C, Caseiro AC, Abujadi JM. (1975). Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birefringence curves. *Ann Histochem*. 20(1):15-26.

36- Oakes, BW, Paker AW, Normal J. (1982). Changes in collagen fiber population in young rat cruciate ligaments in response to a one month intensive exercise program. *Connect Tissue Res*. 9:212.

37- Michna H. (1984). Morphometric analysis of loading-induced changes in collagen-fibril populations in young tendons. *Cell Tissue Res*. 236(2):465-470.

38- Galeski A, Kastelic J, Baer E, Kohn RR. (1977). Mechanical and structural changes in rat tail tendon induced by alloxan diabetes and aging. *J Biomech*. 10(11/12): 775-782.

39- Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. (1972). Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol*. 224(1):231-244.

40- Vidal, BC. (1986). Evaluation on the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell. Mol. Biol*. 32:527-535.

41- Willy RW, Kyle BA, Moore SA, Chleboun GS. (2001). Effect of cessation and resumption of static hamstring muscle stretching on joint range of motion. *J Orthop Sports Phys Ther.* 31(3):138-144.

42- Halbertsma JP, van Bolhuis AI, Goeken LN. (1996). Sport stretching: effect on passive muscle stiffness of short hamstrings. *Arch Phys Med Rehabil.* 77(7):688-692.

43- Antonio J, Gonyea WJ. (1993). Role of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia in intermittently stretched avian muscle. *J Appl Physiol.* 74(4):1893-1898.

44- Alway SE, Gonyea WJ, Davis ME. (1990). Muscle fiber formation and fiber hypertrophy during the onset of stretch-overload. *Am J Physiol.* 259(1 Pt 1):C92-102.

45- Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Tanaka N. (2003). Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 84(3):419-423.

46- Gomes ARS, Soares AG, Peviani SM, Nascimento RB, Moriscot AS, Salvini TF. (2006). The effect of 30 minutes of passive stretch of rat soleus on the myogenic differentiation myostatin and atrogen-1 Gene expressions. *Arch Phys Med Rehabil* 87:141-146.

47- Willy RW, Kyle BA, Moore SA, Chleboun GS. (2001). Effect of cessation and resumption of static hamstring muscle stretching on joint range of motion. *J Orthop Sports Phys Ther.* 31(3):138-144.

48- Glass DJ. (2003). Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol.* 5(2):87-90.

49- Goldspink DF, Garlick PJ, McNurlan MA. (1983). Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscles undergoing compensatory growth and subsequent denervation atrophy. *Biochem J.* 15;210(1): 89-98.

50- Ansved T. (1995). Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand.* 154(3): 291-302.

51- Shaffer MA, Okereke E, Esterhai JL Jr, Elliott MA, Walker GA, Yim SH, Vandeborne K. (2000). Effects of immobilization on plantar-flexion torque, fatigue resistance, And functional ability following an ankle fracture. *PhysTher.* 80(8):769-780.

52- Seki K, Taniguchi Y, Narusawa M. (2001). Effects of joint immobilization on firing rate modulation of human motor units. *J Physiol.* 1;530(Pt 3):507-519.

53- Jagoe RT, Goldberg AL. (2001). What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 4(3):183-190.

54- Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J.* 18(9):1025-1027.

55- Zemková H, Teisinger J, Almon RR, Vejsada R, Hník P & Vyskocil F. (1990). Immobilization atrophy and membrane properties in rat skeletal. *Pflügers Arch Europ J Physiol.* 16:126-129.

56- Hynes RO. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69(1):11-25.

57- Ruwhof C, van der Laarse A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res.* 47(1):23-37.

58- Ross RS, Pham C, Shai SY, Goldhaber JI, Fenczik C, Glembotski CC, Ginsberg MH, Loftus JC. (1998). Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 82(11):1160-1172.

Table 1. Effect of bouts stretch on immobilized soleus muscle weight.

	Right soleus (g)	Left soleus (g)	Relative difference (%)
I	0,19 ± 0,03	0,13±0,04*	-44 ±6,1 ▼
I+3Wfree	0,19±0,01	0,17±0,02	-10±2,2 †
I+3StW	0,17±0,01	0,18±0,02	6±1,7●
I+DailySt	0,18±0,03	0,21±0,02*	13,1±2,8 †●
C	0,24±0,02	0,24±0,02	1,7±1,3●

I: soleus muscle immobilized in the shortened position for 4 weeks; *I+3Wfree*: after the immobilization, the animals remained free for 3 weeks; *I+3StW*: after immobilization, soleus muscle was stretched 3 times a week for 3 weeks; *I+DailySt*: after immobilization, soleus muscle was stretched daily for 3 weeks; C= animals not submitted to either procedure of immobilization and stretch. P < 0,01 compared to the contra lateral soleus. ▼P<0,01 compared to the all groups, ● P<0,01 compared to the relative difference I and I+3Stfree group, † P<0,01 compared to the relative difference C group. The results are mean ± standard deviation

Table 2: Effect of stretching bouts on optical retardation of birefringence of intramuscular connective tissue.

	Left soleus	Right soleus	Relative difference (%)
I	11.9±3.7	16.1±4.5*	25.7±1.7
I+3Wfree	10.7±2,1	10.5±2.5	1,8±0,8
I+3StW	11.2±2,1	11.4±1,8	1.9±0,7
I+DailySt	12.4±2.2	10.1±2.4*	13.8±5.4
C	12.6±2,4	12.4±2,6	2.7±0.9

I: soleus muscle immobilized in the shortened position for 4 weeks; *I+3Wfree*: after the immobilization, the animals remained free for 3 weeks; *I+3StW*: after immobilization, the soleus muscle was stretched 3 times a week for 3 weeks; *I+DailySt*: after immobilization, the soleus muscle was stretched daily for 3 weeks; *C*: animals not submitted to either procedure of immobilization and stretch. * $P < 0.05$ compared to the contra lateral soleus. The results are mean \pm standard deviation.

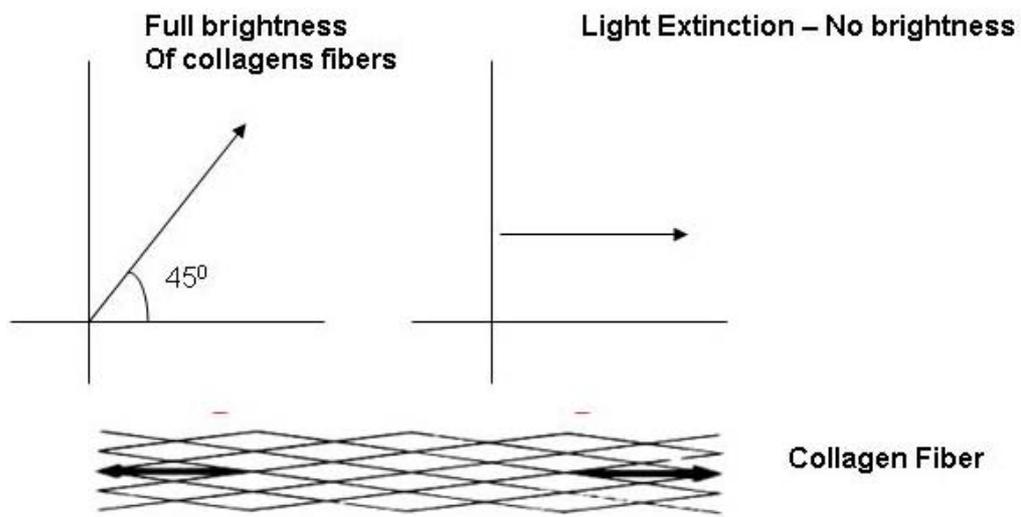


Figure 1

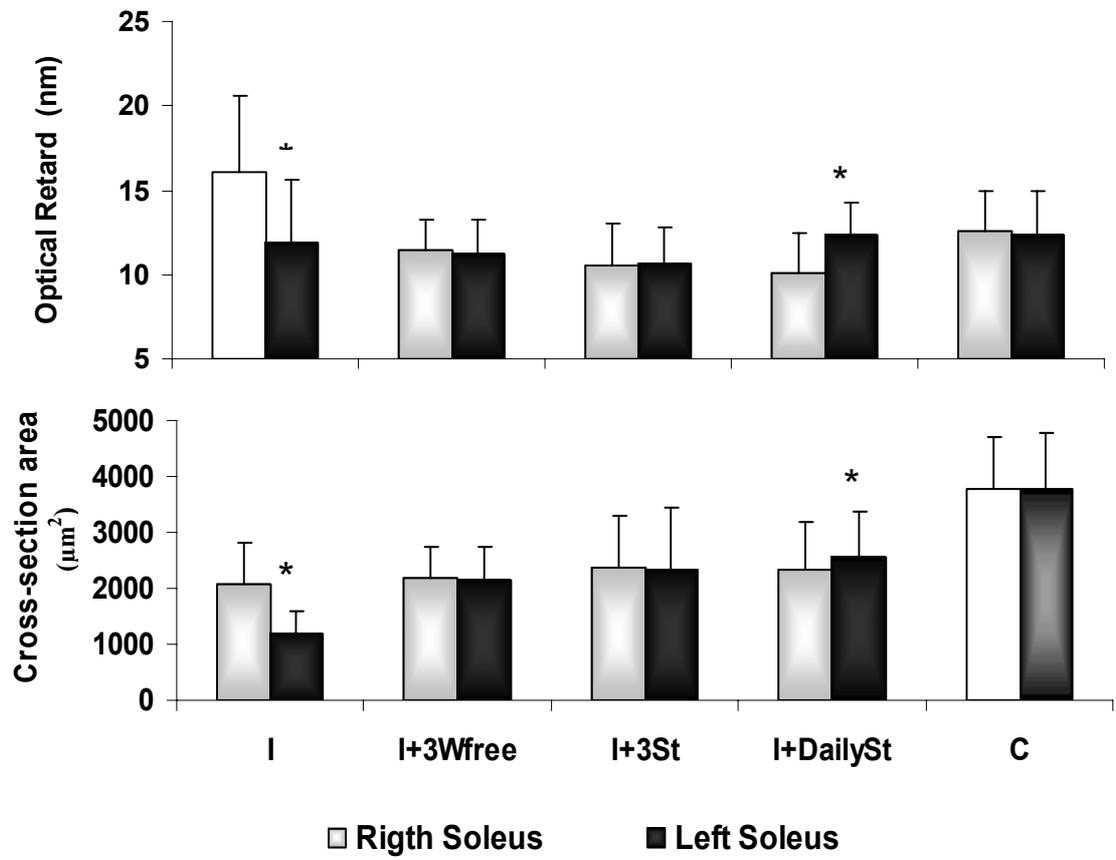


Figure 2

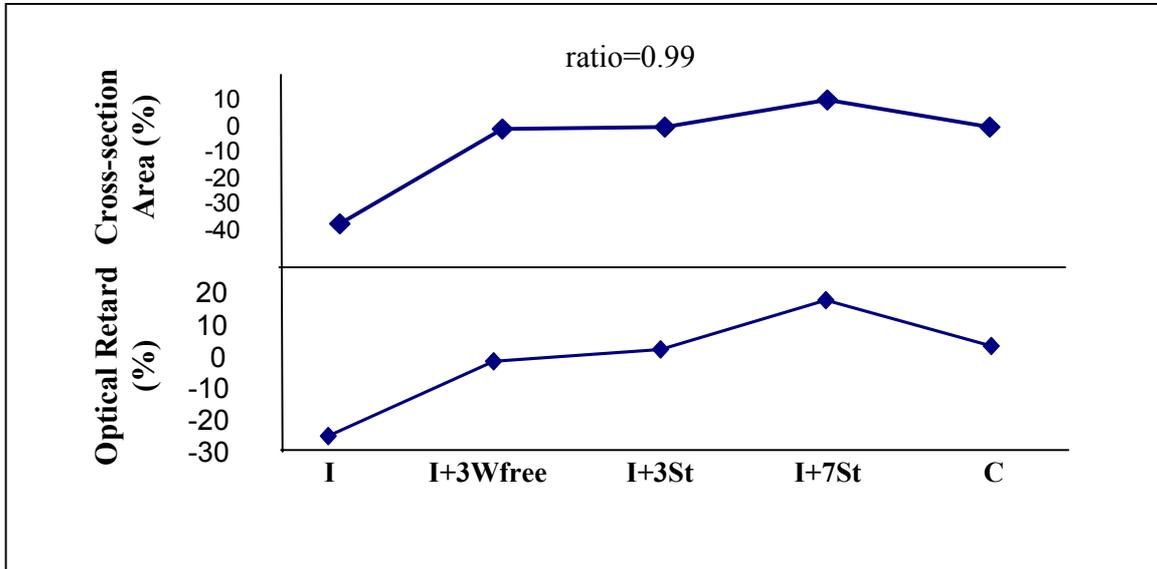


Figure 3

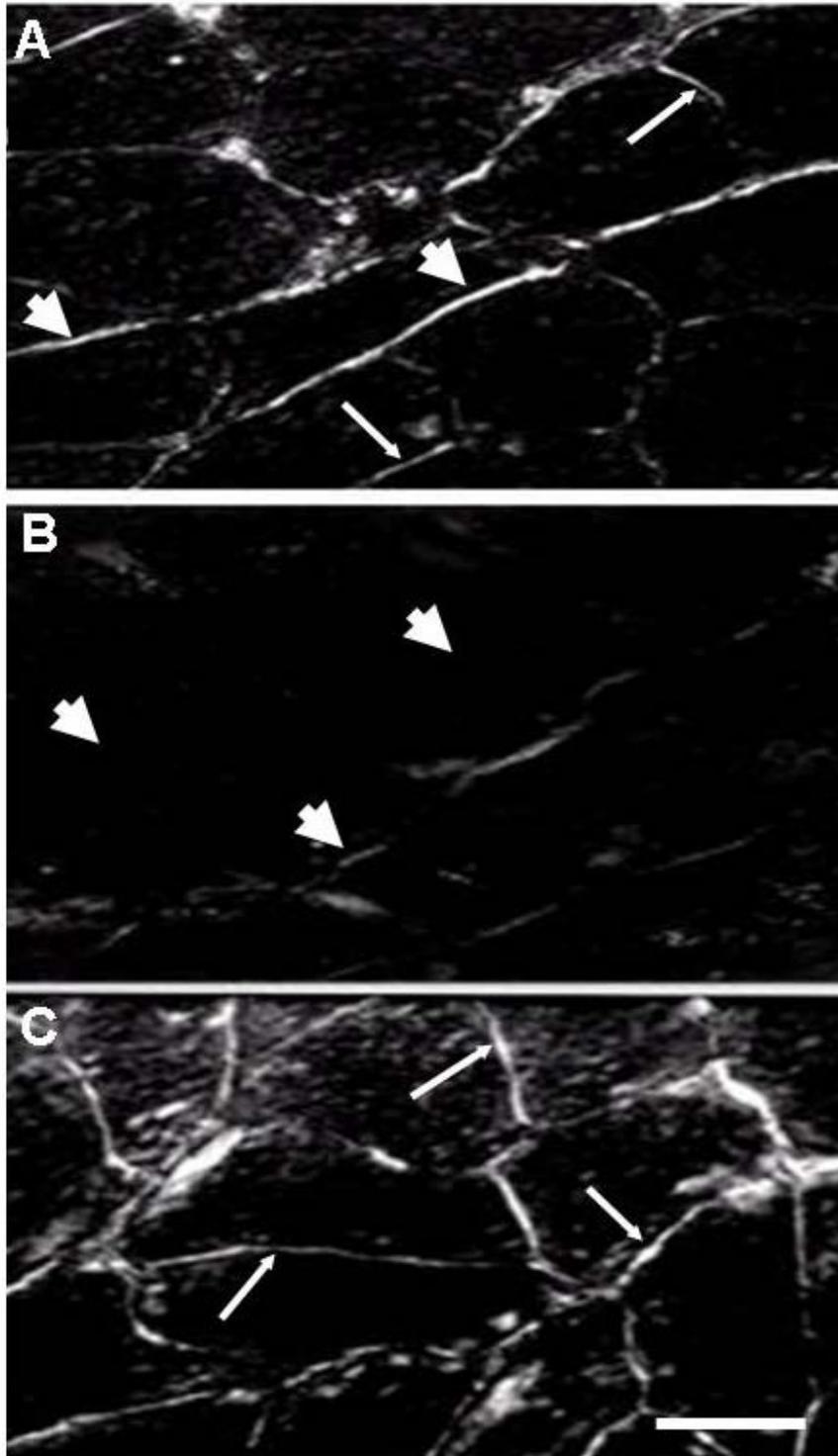


Figure 4

Legend of Figures

Figure 1: Hypothetical schema of the connective tissue positioned between polarizers. When the collagen fiber is 45° to the plane of polarized light it shows full brightness and when it is oriented parallel the brightness is extinct.

Figure 2: The effect of bouts of passive stretch in the optical retards of the birefringence collagen fibers (A) and cross-section area of the soleus muscle fibers (B). *I*: soleus muscle immobilized in the shortened position for 4 weeks; *I+3Wfree*: after the immobilization, the animals remained free for 3 weeks; *I+3StW*: after immobilization, the soleus muscle was stretched 3 times a week for 3 weeks; *I+DailySt*: after immobilization, the soleus muscle was stretched daily for 3 weeks; *C*= animals not submitted to either procedure of immobilization and stretch. * $P < 0,01$ compared to the contra lateral soleus. The results are mean \pm standard deviation.

Figure 3: Correlation between relative cross-section area of muscle fibers and the relative optical retardation of birefringence that represent the aggregation state of collagen fibers. *I*: soleus muscle immobilized in the shortened position for 4 weeks; *I+3Wfree*: after the immobilization, the animals remained free for 3 weeks; *I+3StW*: after immobilization, the soleus muscle was stretched 3 times a week for 3 weeks; *I+DailySt*: after immobilization, the soleus muscle was stretched daily for 3 weeks; *C*= animals not submitted to either procedure of immobilization and stretch

Figure 4: The effect of passive stretch bouts in the macromolecular organization of collagen bundles in the soleus muscle through birefringence of collagen fibers from connective intramuscular tissue. A (Control): strong birefringence of collagen thick fibers from perimysium (arrows head) and of thin fibers endomysium (arrows). B: (immobilized group): birefringence faint (arrow head) or absent. C: (immobilized and stretched 7 times a week group): strong birefringence of collagen bundles of the endomysium (arrows) in all the connective tissue when compared to the control soleus muscle control and immobilized soleus. Bar: 75 μm .

8.2- Artigos Publicados