

Morfologia dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos Wistar imobilizados e remobilizados em meio aquático

Morphology of soleus and tibial anterior muscles of Wistar rats immobilized and remobilized in aquatic environment

Regina Inês Kunz¹; Josinéia Gresele Coradini²; Lígia Inez Silva³; Camila Mayumi Martin Kakhata⁴; Rose Meire Costa Brancalhão⁵; Gladson Ricardo Flor Bertolini⁵; Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro⁵

¹Mestre em Biociências e Saúde – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Doutoranda em Biologia Celular – Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR – Brasil.

²Mestre em Biociências e Saúde – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Cascavel, PR – Brasil.

³Graduada em Fisioterapia – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Residente no Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná – HC/UFPR, no Programa de Residência Integrada Multiprofissional em Atenção Hospitalar, Curitiba, PR – Brasil.

⁴Graduada em Fisioterapia – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Cascavel, PR – Brasil.

⁵Docentes do programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Cascavel, PR – Brasil.

Endereço para correspondência

Regina Inês Kunz
Rua: Universitária, 2.069
85819-110 – Cascavel – Paraná [Brasil]
regina_kunz@hotmail.com

Resumo

Introdução: O músculo esquelético se adapta continuamente a estímulos. **Objetivo:** Analisar os efeitos da imobilização e remobilização sobre parâmetros morfológicos dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos Wistar. **Métodos:** Dezoito animais foram imobilizados por 15 dias, divididos em três grupos de seis componentes cada: G1 – somente imobilizados; G2 – remobilizados livremente; G3 – remobilizados em meio aquático. Foram coletados os músculos sóleo e tibial anterior, direitos (imobilizados ou tratados) e esquerdos (controle). **Resultados:** A imobilização reduziu massa, diâmetro da fibra e comprimento do músculo sóleo, e massa muscular do tibial anterior. Em G2 e G3, houve aumento da massa e comprimento muscular do tibial anterior; e aumento do menor diâmetro da fibra do sóleo em G3. **Conclusão:** A imobilização afeta a morfologia dos músculos estudados, a remobilização livre e em meio aquático foram eficientes na recuperação do tibial anterior, enquanto para o sóleo apenas os exercícios aquáticos foram eficazes.

Descritores: Atrofia muscular; Exercício físico; Músculo esquelético; Natação.

Abstract

Introduction: Skeletal muscle has the ability to continuously adapt to different stimuli. **Objective:** To analyze the effects of immobilization and remobilization on morphology parameters of soleus and tibial anterior of Wistar rats. **Methods:** Eighteen animals were immobilized for 15 days and divided into three groups of six animals each: G1 – only immobilized; G2 – remobilized freely; G3 – remobilized in water. The soleus and tibial anterior muscles both rights (immobilized or treated) and left (control) were collected. **Results:** Immobilization reduced muscle mass, fiber diameter and length of the soleus and muscle mass of tibial anterior. In G2 and G3 was an increase in muscle mass and length of tibial anterior; and an increase in fiber diameter on soleus in G3. **Conclusion:** Immobilization affects soleus and tibial anterior morphology, free and aquatic remobilization were effective in tibial anterior muscle recovery, however in the soleus muscle only the aquatic exercises were efficient.

Key words: Skeletal muscle; Swimming; Muscular atrophy; Physical exercise.

Introdução

O músculo esquelético totaliza 40% a 50% da massa corporal^{1,2} e tem uma elevada capacidade de adaptação estrutural e funcional, a chamada plasticidade neuromuscular. Dessa forma, a massa e a composição são diretamente relacionadas com a função muscular, podendo ser reguladas de acordo com a carga de trabalho, a atividade e as condições patológicas³⁻⁵. Ainda, estímulos podem acarretar alterações musculares, como a imobilização, um recurso terapêutico frequentemente usado no tratamento de injúrias musculoesqueléticas^{6,7}.

O maior efeito observado no tecido muscular submetido a períodos de imobilização é a atrofia muscular. Este processo parece ser altamente ordenado e regulado, caracterizado pela diminuição da área de secção transversa da fibra muscular e conteúdo proteico. Essas alterações, resultam em redução da capacidade de produção de força, diminuição da ativação elétrica, aumento da fadigabilidade e resistência à insulina^{5,8}.

Além disso, a imobilização pode causar mudanças na relação força-comprimento de acordo com a posição em que o músculo é imobilizado⁸. Shah et al.⁹ observaram que o número de sarcômeros varia em resposta à perturbação crônica do comprimento, e a imobilização em posição encurtada diminuiu sua quantidade, enquanto em posição alongada, a aumentou.

Diferentes técnicas e exercícios têm sido estudados na tentativa de reverter os danos celulares causados pela imobilização, entre eles a corrida em esteira^{10,11}, ultrassom terapêutico¹², alongamento passivo^{13,14}, estimulação elétrica neuromuscular¹⁵ e remobilização livre¹⁶. Apesar disso, ainda não há um modelo ideal de remobilização que permita ao músculo retornar às suas características morfológicas do momento pré-imobilização.

O objetivo neste estudo foi analisar o efeito da imobilização e do protocolo de remobilização composto pela associação de exercício aeróbico (natação) e exercício resistido (salto

em meio aquático) sobre parâmetros de massa muscular, menor diâmetro da fibra muscular e comprimento muscular dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos da linhagem Wistar.

Materiais e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Cascavel (PR), sob o protocolo 03012, seguindo todas as diretrizes internacionais para o estudo com animais.

Foram utilizados 18 ratos machos da linhagem Wistar, com 10±2 semanas de idade, peso entre 300 e 350 gramas, mantidos em fotoperíodo claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*, os quais foram divididos em três grupos experimentais, com seis ratos em cada grupo, do seguinte modo:

- G1: animais que tiveram seu membro posterior direito imobilizado por 15 dias.
- G2: roedores com membro posterior direito imobilizado por 15 dias, que, em seguida, realizaram remobilização livre na gaiola por 14 dias; sendo colocados em contato com a água por aproximadamente um minuto, de maneira que recebessem estímulo aquático diariamente.
- G3: ratos com membro posterior direito imobilizado por 15 dias, sendo remobilizados por 14 dias por meio de natação e salto em meio aquático, realizados em dias alternados, totalizando sete dias de tratamento com natação, e sete, com salto.

Neste trabalho, os valores reportados para o membro esquerdo serviram como controle na verificação de adaptações ocorridas no membro direito (imobilizado), da mesma forma que o realizado no estudo de Baroni et al.⁸.

Para a confecção do aparato de imobilização, foi utilizada uma atadura gessada, composta por ligadura de tecido saturada com sulfato

de cálcio desidratado (CaSO_4). Todos os grupos experimentais tiveram a descrita órtese moldada diretamente no membro posterior direito de cada animal, sendo colocada em toda a extensão do membro de forma que esse permaneceu em extensão da articulação do joelho e flexão plantar completa do tornozelo, ou seja, em posição de encurtamento do músculo sóleo e alongamento do tibial anterior.

Após a retirada do aparato de imobilização, que foi mantido por um período de 15 dias consecutivos e verificado diariamente, foi iniciado o protocolo de remobilização. Aos animais do G2, foi permitida a remobilização livre na gaiola e estes foram apenas colocados em contato com a água, a fim de garantir o mesmo tratamento entre os grupos experimentais, minimizando diferentes respostas de estresse pela ação do contato com o meio aquático. Já os ratos do G3, foram submetidos à remobilização, alternando exercícios de natação e salto em meio aquático por 14 dias, sendo esses previamente treinados por cinco dias consecutivos, antes do período de imobilização. Nos seis primeiros dias de remobilização, a natação foi realizada durante 20 minutos, e os saltos foram efetuados em duas séries de dez saltos cada. Nos oito dias restantes de remobilização, efetuou-se uma progressão quanto ao tempo e às séries dos exercícios realizados, sendo o tempo de natação 40 minutos, e os saltos foram executados em quatro séries de dez saltos cada.

O exercício de natação foi efetuado sem nenhuma sobrecarga, enquanto o de salto foi executado em meio aquático com sobrecarga de 50% do peso corporal¹⁷.

Os animais do G1, logo após o período de imobilização, e os de G2 e G3, depois da remobilização, foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg). Sob o efeito dos anestésicos, os ratos foram decapitados em guilhotina. Em seguida, foram coletados os músculos tibial anterior e sóleo, tanto direito quanto esquerdo. Previamente à fixação em formol 7%, esses músculos foram pesados em balança analítica de

precisão (Shimadzu® – Japão) para obtenção da massa muscular dada em gramas (g). Os músculos foram também mensurados quanto ao comprimento máximo de repouso por meio de paquímetro digital (Digimess® – São Paulo, Brasil) para obtenção do comprimento muscular, fornecido em milímetros (mm).

Após a fixação, os músculos sóleos e tibiais anteriores foram armazenados em álcool 70% e seguiram o procedimento histológico de rotina para emblocamento em parafina. Foram obtidos cortes transversais de 7 μm das fibras musculares, corados em hematoxilina e eosina¹⁸.

Os campos de interesse nas lâminas foram fotomicrografados na objetiva de 40x para as análises morfológicas e de menor diâmetro de 100 fibras por músculo, utilizando-se o programa Image-Pro-Plus 6.0® (USA), dado em micrômetros (μm).

Os dados obtidos foram analisados com auxílio do programa SPSS 17.0 e apresentados em média e desvio-padrão. Para realizar a comparação dos diferentes grupos e lados em conjunto, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) modelo misto, de acordo com as diferentes variáveis avaliadas. O nível de significância aceito foi 5%.

Resultados

Massa muscular

Houve variação significativa na massa muscular do sóleo com estatística $F(1,15)=5,678$; $p=0,031$. Na comparação entre os grupos, não houve diferenças ($p=1,00$). Contudo, ao comparar os lados, verificou-se diferença de 0,043 g menor para o lado imobilizado ($p=0,031$) (Tabela 1).

Os resultados da massa muscular do tibial anterior apresentaram valores $F(1,15)=4,664$; $p=0,047$. Na comparação entre os grupos, a massa muscular de G1 foi significativamente menor que a do G2 e a do G3 ($p=0,001$), não sendo observada diferença entre G2 e G3 ($p=0,339$). O lado imobilizado apresentou massa muscular

0,049 g menor que o lado contralateral, sendo esta diferença significativa ($p=0,047$) (Tabela 1).

Menor diâmetro da fibra muscular

O menor diâmetro das fibras do músculo sóleo apresentou valor $F(1,15)=26,724$; $p=0,001$. Na comparação entre os grupos, não houve diferença entre G1 e G2 ($p=0,140$), e entre G2 e G3 ($p=1,00$), porém houve um aumento de $3,792 \mu\text{m}$ no diâmetro de G3 em relação ao do G1 ($p=0,025$). Ao comparar os lados, o diâmetro da fibra muscular do sóleo direito foi $3,182 \mu\text{m}$ menor que o lado esquerdo ($p=0,001$) (Tabela 1). Não houve variação significativa no menor diâmetro da fibra do músculo tibial anterior neste estudo, com estatística $F(1,15)=0,235$; $p=0,635$ (Tabela 1).

Comprimento muscular

O comprimento muscular do sóleo apresentou estatística $F(1,15)=17,097$; $p=0,001$. Não houve variação significativa entre os grupos ($p=1,00$) e, na comparação entre os lados, verificou-se redução de $2,913 \text{ mm}$ no lado imobilizado em relação ao controle ($p=0,001$) (Tabela 1).

O comprimento muscular do tibial anterior apresentou estatística $F(1,15)=0,224$; $p=0,643$. Os valores de G1 foram significativamente menores que os de G2 ($p=0,001$) e os de G3 ($p=0,002$), não havendo diferença entre os valores de G2 e os de G3. Ao comparar os lados, também não houve diferença estatística ($p=0,643$) (Tabela 1).

Análise Morfológica

Os músculos sóleo e tibial anterior, controles do experimento, apresentavam células em formato poligonal, núcleos periféricos e padrão fascicular normal (Figura 1A e 1D).

Nos animais submetidos ao período de imobilização (G1), foi verificado um desarranjo na organização tecidual dos músculos sóleo e tibial anterior com aparecimento de fibras polimórficas de aspecto arredondado, mais evidente no músculo tibial anterior, bem como uma maior

quantidade de tecido conjuntivo intramuscular (Figura 1B e 1E).

Tanto a remobilização livre (G2) quanto a remobilização por exercícios por associação de natação e salto em meio aquático (G3) restabeleceram as características morfológicas dos músculos sóleo e tibial anterior (Figura 1C e 1F).

Discussão

Estudos em modelos animais demonstram a plasticidade muscular diante de diferentes estímulos, causando alterações no tamanho e peso das fibras musculares, no comprimento e na quantidade de tecido conjuntivo⁹. Essas adaptações foram também encontradas nos músculos sóleo e tibial anterior dos animais nesta pesquisa.

Fibras musculares lentas (tipo I), predominantemente oxidativas parecem ser mais susceptíveis à atrofia muscular por desuso do que as fibras musculares rápidas (tipo II), devido a mudanças no metabolismo da fibra¹⁹. Porém, no atual estudo, observou-se uma diminuição da massa muscular tanto no músculo sóleo (predominantemente tônico), quanto no músculo tibial anterior (predominantemente fásico), imobilizados em relação aos músculos contralaterais.

Natali et al.¹¹ também verificaram que 15 dias de imobilização em flexão plantar máxima diminuiu a massa muscular do sóleo. Resultados semelhantes na diminuição do peso do sóleo, quando imobilizado em encurtamento por 21 dias, foram encontrados por Menon et al.¹³.

Fujita et al.²⁰ observaram que a suspensão do membro posterior de ratos Wistar por sete dias, mimetizando o desuso muscular, resultou em atrofia do tibial anterior, caracterizado pela diminuição da massa muscular e da área de seção transversa das fibras tipo I, IIA e IIB.

Alguns autores sugerem que a imobilização em encurtamento muscular aumenta o número de microlesões nas miofibrilas, levando ao aumento de espécies reativas de oxigênio e radicais livres no tecido muscular, consequentemente, diminuindo a miofibrillogênese e a massa

Tabela 1: Resultados da massa muscular, menor diâmetro da fibra e comprimento dos músculos sóleo e tibial anterior nos diferentes grupos experimentais

Parâmetros			Massa muscular (g)* †	Menor diâmetro (µm)*	Comprimento Muscular (mm)*
G1	Sóleo ^a	Direito	0,07±0,01	30,30±2,00	18,75±2,36
		Esquerdo	0,13±0,09	31,32±2,30	25,61±2,75
	Tibial anterior ^{b,c}	Direito	0,42±0,03	34,57±2,78	16,95±1,20
		Esquerdo	0,41±0,06	33,09±2,37	17,43±1,24
G2	Sóleo	Direito	0,10±0,03	30,88±2,60	21,77±0,78
		Esquerdo	0,12±0,06	36,16±3,00	23,26±1,71
	Tibial anterior	Direito	0,63±0,09	32,45±1,85	21,30±1,31
		Esquerdo	0,63±0,08	34,41±2,66	20,86±1,90
G3	Sóleo	Direito	0,09±0,02	32,98±3,08	22,23±1,36
		Esquerdo	0,13±0,01	36,23±1,92	22,62±0,94
	Tibial anterior	Direito	0,51±0,07	32,75±2,66	19,80±1,98
		Esquerdo	0,65±0,07	33,11±2,50	20,42±1,41

Valores expressos em média ± desvio-padrão. * – diferença estatisticamente significativa entre o lado imobilizado e tratado do sóleo: massa muscular (p=0,031), menor diâmetro da fibra (p=0,001), comprimento muscular (p=0,001). † – diferença estatisticamente significativa da massa muscular entre o lado imobilizado e tratado do tibial anterior (p=0,047). ^a – diferença estatisticamente significativa entre o menor diâmetro da fibra de G1 e G3 do músculo sóleo (p=0,025). ^b – diferença estatisticamente significativa entre a massa muscular de G1 e G2 (p=0,001), e G1 e G3 (p=0,001). ^c – diferença estatisticamente significativa entre o comprimento muscular de G1 e G2 (p=0,001), e G1 e G3 (p=0,002).

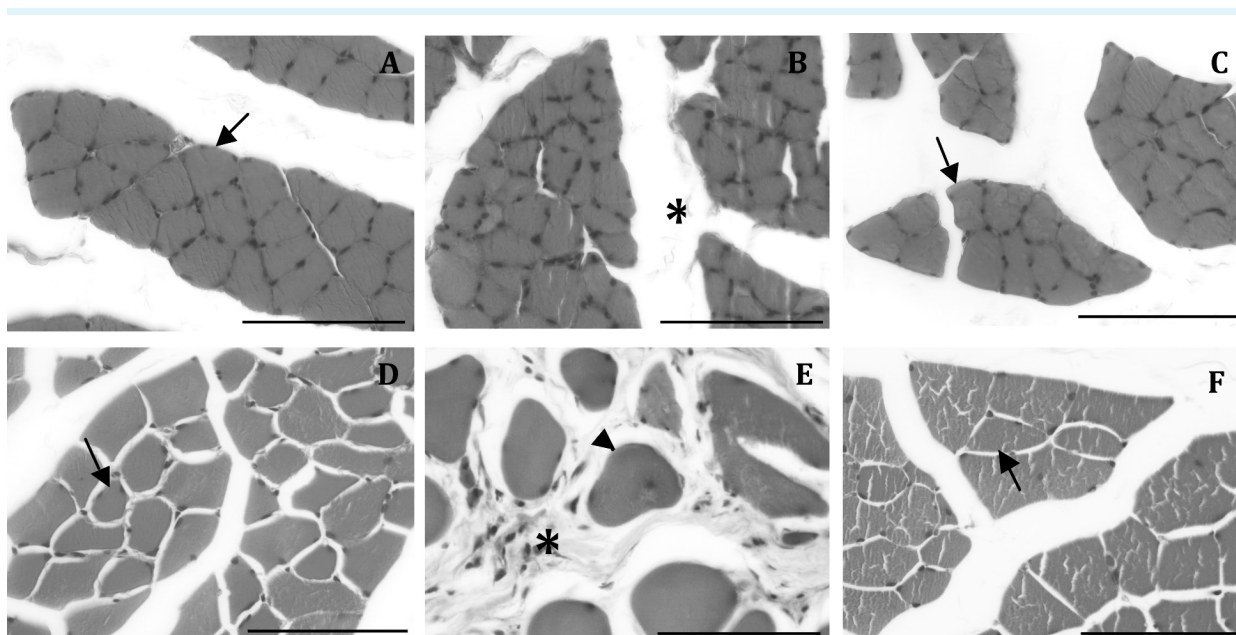


Figura 1: Fotomicrografias dos músculos sóleo (A, B, C) e tibial anterior (D, E, F) de ratos da linhagem Wistar, coloração em hematoxilina e eosina. Em A e D (controle), fibras com formato poligonal e núcleos periféricos (seta preta). Em B e E (G1), fibras polimórficas (cabeça de seta) e maior quantidade de tecido conjuntivo (* asterisco). Em C e F (G3), fibras com formato poligonal e núcleos periféricos (seta preta). Escala 100 µm

muscular¹⁴. Järvinen et al.²¹ afirmam ainda que os músculos imobilizados em alongamento sofrem atrofia muscular menos evidente e menor perda de proteínas elásticas, quando comparado com músculos imobilizados em encurtamento. Essas postulações corroboram este trabalho, no qual a imobilização diminuiu o diâmetro da fibra muscular apenas no sóleo, e não houve alterações no menor diâmetro do músculo tibial anterior.

Lima et al.⁴ observaram que a imobilização diminuiu a tensão ativa e passiva atuante sobre o músculo, levando a uma alteração no metabolismo dos fibroblastos, que por sua vez respondem com o aumento da área de tecido conjuntivo intramuscular, principalmente na imobilização em encurtamento²². Józsa et al.²³ acrescentam ainda que esse aumento do tecido conjuntivo cria uma barreira mecânica ao influxo sanguíneo para o músculo, diminuindo o número de capilares na fibra o que pode causar atrofia muscular.

Na comparação entre os grupos, verificou-se que os ratos do G2 e os do G3 restabeleceram a massa muscular do tibial anterior, o que não foi observado para o músculo sóleo. Essa capacidade de retornar ao peso pré-imobilização do músculo tibial anterior parece ocorrer devido ao menor número de lesões nas miofibrilas e também a uma reorganização do tecido conjuntivo, melhorando o fluxo sanguíneo. Em um estudo prévio, foi verificado que o músculo tibial anterior de animais submetidos a um período de remobilização recuperou as características celulares normais, tanto em relação às fibras musculares quanto ao aspecto e quantidade de tecido conjuntivo (Kunz et al.²⁴). Stone²⁵ afirma que o exercício físico pode aumentar a força do tecido conjuntivo bem como a massa muscular, tornando o músculo mais resistente.

A remobilização com exercícios do G3 levou a um aumento do diâmetro da fibra muscular do sóleo em relação ao grupo somente imobilizado. Järvinen e Lehto²⁶ afirmam que as injúrias nas miofibrilas do músculo esquelético são dependentes de uma recuperação do fluxo sanguíneo e que a arquitetura e o tamanho das

miofibrilas são mais rapidamente restaurados quanto mais ativa for a remobilização. Assim, observou-se na atual pesquisa uma recuperação da capacidade contrátil do sóleo após a remobilização, embora essa não tenha sido eficaz em restaurar a massa muscular desse músculo.

As alterações morfológicas observadas nos músculos sóleo e tibial anterior submetidos ao período de 14 dias de imobilização indicam o potencial lesivo do desuso muscular, como proposto por Brito et al.²⁷. Dessa forma, as alterações na massa muscular do sóleo e tibial anterior, após a imobilização e a remobilização, são o resultado de mudanças microscópicas, como alterações nas fibras musculares e quantidade de tecido conjuntivo intramuscular.

A imobilização pode também causar alterações no comprimento da fibra muscular pela adição ou diminuição do número de sarcômeros, ou ainda pela alteração no seu tamanho^{4,28}. Embora no estudo aqui apresentado não tenham sido analisados aspectos referentes ao número ou comprimento médio dos sarcômeros, observou-se uma diminuição do comprimento muscular do sóleo imobilizado em relação ao sóleo controle. Menon et al.¹³ também verificaram que 21 dias de imobilização em encurtamento do músculo sóleo diminuiu 12,74% do seu comprimento muscular em relação ao controle.

O músculo tibial anterior não teve seu comprimento alterado pela imobilização. Porém, foi verificado que tanto a remobilização livre quanto os exercícios aumentaram o comprimento muscular do tibial anterior em relação ao grupo controle. Esse dado pode ter ocorrido por um aumento do comprimento médio do sarcômero, ou pela adição de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular. Gomes et al.²⁹ afirmam que a remobilização por meio de exercícios pode produzir adaptações rápidas no comprimento funcional do sarcômero.

Como limitações deste estudo, salienta-se que não foram realizadas as análises referentes ao número de sarcômeros em série e ao comprimento médio dos sarcômeros na fibra muscular, análises essas que se sugerem sejam realizadas

em estudos futuros. Ressalta-se também o fato de que o G3 foi remobilizado pela combinação da natação com o exercício de salto, dificultando a compreensão de qual intensidade e que tipo de exercício apresenta-se mais benéfico na restauração dos parâmetros musculares pré-imobilização. Recomenda-se que em novos trabalhos os grupos executem os exercícios separadamente.

Conclusão

Neste estudo, verificou-se que a imobilização produziu alterações significativas sobre a massa, menor diâmetro da fibra e do comprimento muscular do sóleo, bem como diminuição na massa muscular e na morfologia das fibras do tibial anterior. Tanto a remobilização livre quanto a remobilização por exercícios aumentaram a massa e o comprimento muscular do tibial anterior. A natação combinada com o salto em meio aquático aumentaram o menor diâmetro do músculo sóleo. E as remobilizações livre e com exercícios terapêuticos foram capazes de restabelecer a organização tecidual.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de Mestrado, à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao programa de Mestrado em Biociências e Saúde pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

1. Powers SK, Smuder AJ, Criswell DS. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(1):2519-28.
2. Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Muscle plasticity and β -adrenergic receptors: adaptative responses of β -adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1-10.
3. Hood DA, Irrcher I, Ljubic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol*. 2006;209:2265-75.
4. Lima SC, Caierão QM, Durigan JLQ, Schwarzenbeck A, Silva CA, Minamoto VB, et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfológicas e mecânicas no músculo de rato. *Rev Bras Fisioter*. 2007;11(4):297-302.
5. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses*. 2007;69:310-21.
6. Cornachione AS, Cação-Benedini LO, Benedini-Elias PCO, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. Effects of 40 min of maintained stretch on the soleus and plantaris muscles of rats applied for different periods of time after hindlimb immobilization. *Acta Histochem*. 2013;115(5):505-11.
7. Sakakima H. Effects of immobilization and subsequent low and high frequency treadmill running on rat soleus muscle and ankle joint movement. *J Phys Ther Sci*. 2004;16:43-8.
8. Baroni BM, Galvão AQ, Ritzel CH, Diefenhaeler F, Vaz MA. Adaptações neuromusculares de flexores dorsais e plantares a duas semanas de imobilização após entorse de tornozelo. *Rev Bras Med Esporte*. 2010;16(5):358-62.
9. Shah SB, Peters D, Jordan KA, Milner DJ, Fridén J, Capetanaki Y, et al. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol*. 2001;204:1703-10.
10. Morimoto A, Winaga H, Sakurai H, Ohmichi M, Yoshimoto T, Ohmichi Y, et al. Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats. *Neurosci Lett*. 2013; 534:295-300.
11. Natali LH, Silva TS, Ciena AP, Padoin MJ, Alves ÉPB, Aragão FA, et al. Efeitos da corrida em esteira em músculos sóleos de ratos encurtados por imobilização. *Rev Bras Med Esporte*. 2008;14(6):490-3.
12. Cunha DM, Nascimento CM, Artifon EL, Ferrari D, Ribeiro LFC, Fontanesi LB, et al. Evaluation of rats' soleus muscle submitted to remobilization protocol with therapeutic ultrasound associated with static stretching. *J Morphol Sci*. 2012;29(1):53-7.



13. Menon T, Casarolli LM, Cunha NB, Souza L, Andrade PHM, Albuquerque CE, et al. Influência do alongamento passivo em três repetições de 30 segundos a cada 48 horas em músculo sóleo imobilizado de ratos. *Rev Bras Med Esporte.* 2007;13(6):407-10.
14. Rocha WA, Gobbi GA, Araujo VF, Santuzzi CH, Coutinho GC, Nogueira BV, et al. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membro posterior. *Rev Bras Med Esporte.* 2010;16(6):450-4.
15. Durigan JLQ, Cancelliero KM, Bosi PL, Delfino GB, Montebelo MIL, Guirro RRJ, et al. Metabolic and morphometric alterations inherent to neuromuscular electric stimulation in the antagonist muscle submitted to ankle joint immobilization. *Braz Arch Biol Technol.* 2009;52(1):85-91.
16. Polizello JC, Carvalho LC, Freitas FC, Padula N, Martinez EZ, Mattinello-Sverzut AC. Efeitos morfológicos do retorno da sobrecarga após imobilização em alongamento de músculo esquelético de ratas. *Rev Bras Fisioter.* 2011;15(1):73-9.
17. Gaffuri J, Meireles A, Rocha BP, Rosa CT, Artifon EL, Silva LI, et al. Avaliação do exercício físico como fator de analgesia em um modelo experimental de ciatalgia. *Rev Bras Med Esporte.* 2011;17(2):115-8.
18. Junqueira LC, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos; 1983.
19. Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization: a review. *Sports Med* 1990;10(1):42-58.
20. Fujita N, Murakami S, Arakawa T, Miki A, Fujino H. The combined effect of electrical stimulation and resistance isometric contraction on muscle atrophy in rat tibialis anterior muscle. *Bosn J Basic Med Sci.* 2011;11(2):74-9.
21. Järvinen TAH, Józsa L, Kannus P, Järvinen TLN, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopy study. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23(3):245-54.
22. Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat.* 1984;138:343-504.
23. Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue: a morphometric and microscopy study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72b(2):293-7.
24. Kunz RI, Coradini JG, Rondon CLS, Brancalhão RMC, Bertolini GRE, Ribeiro LFC. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. *Publ UEPG Ci Biol Saúde.* 2013;19(2):123-9.
25. Stone MH. Implications for connective tissue and bone alterations resulting from resistance exercise training. *Med Sci Sports Exerc.* 1988;20(5):162-8.
26. Järvinen MJ, Lehto MUK. The effects of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries. *Sports Med.* 1993;15:78-89.
27. Brito MKM, Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Tarumoto MH, Dal Pai V, Giacometti JA. Geometrical dimensions of fibers from the soleum muscle in rats exercised on treadmill: the importance of the analysis by means of digitalized images. *Rev Bras Med Esporte.* 2006;12(2):103-7.
28. Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol.* 1972;224:231-44.
29. Gomes ARS, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effects of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:1473-80.