



EFEITOS MORFOFUNCIONAIS DO ALONGAMENTO ESTÁTICO NA IMOBILIZAÇÃO PROLONGADA DE MEMBRO POSTERIOR: UM ESTUDO EXPERIMENTAL.

Autores: Bruno Barcellos Jacobsen¹,
Patrick Wander Endlich^{1,2},
Cíntia Helena Santuzzi¹,
Giovanni Rampinelli Farina¹,
Washington Luiz Silva Gonçalves¹.

Instituições:

1. Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória-ES.
2. Faculdade Salesiana de Vitória (FSV) – Vitória-ES.

E-mail: brunobjufes@hotmail.com

RESUMO

O alongamento estático (AL) é frequentemente utilizado na área desportiva, porém, as alterações morfofuncionais ocorridas ainda não estão bem claras, principalmente após imobilização prolongada. O objetivo foi examinar as alterações morfofuncionais musculares produzidas em resposta aos exercícios de AL em modelo animal de imobilização prolongada. Para isso, foram utilizados 32 ratos (Wistar) divididos em 04 grupos (n= 8, cada): grupo controle (CONT), grupo imobilizado por 21 dias (IMOB), grupo remobilizado por 21 dias (LIVRE) e grupo alongados por 21 dias (ALONG). As variáveis analisadas foram: peso corporal e muscular, comprimento muscular e ósseo, número de miofibrilas e quantidade de colágeno, determinadas através de histomorfometria. A IMOB produziu importante hipotrofia com hiperplasia muscular compensatória, aumento ($p < 0,05$) na deposição de colágeno. A remobilização livre ou o alongamento passivo reduziram significativamente ($p < 0,05$) estas alterações morfofuncionais observados no grupo IMOB, embora, somente o AL foi capaz de reduzir a relação entre colágeno/músculo.

Palavras-chave: *fisioterapia manual, alongamento passivo, imobilização prolongada, atrofia muscular, histomorfometria.*

INTRODUÇÃO

O alongamento muscular é frequentemente efetuado em várias práticas terapêuticas e desportivas, com o objetivo de aumentar a flexibilidade muscular e a amplitude articular, assim como, diminuir o risco de lesões e possivelmente melhorar o desempenho dinâmico^(1,2). O alongamento de forma passiva ou estático é realizado por uma força externa, aplicada



manualmente e/ou mecanicamente em um músculo esquelético, enquanto o indivíduo está relaxado⁽³⁾. Estudos prévios demonstraram que o músculo esquelético diminui o comprimento e a extensibilidade quando mantido em posição encurtada (imobilização), ocasionando facilitando o aparecimento de contraturas musculares e atrofia muscular. É definido como contratura muscular, o encurtamento de um músculo ou de outros tecidos moles que cruzam uma articulação, resultando numa limitação da mobilidade articular e atrofia muscular ou hipotrofia como a perda de trofismo⁽¹⁻³⁾.

Inúmeras investigações têm demonstrado que as fibras musculares esqueléticas apresentam uma grande plasticidade, ou seja, têm a tendência de assumir um comprimento novo após as forças externas implicadas pelo alongamento passivo ter sido removida, bem como, após remoção das forças biomecânicas por uma imobilização prolongada. O efeito plástico é garantido devido às propriedades que os tecidos contráteis e não-contráteis possuem de adquirir novos comprimentos na presença ou ausência de novas forças mecânicas⁽³⁻⁷⁾. Mostram ainda que a principal fonte de resistência ao alongamento passivo do músculo é a malha de tecido conjuntivo que há dentro dele, e não os seus componentes contráteis ativos^(3,5,6). Os músculos, principalmente os esqueléticos aumentam seu comprimento por meio da adição de novos sarcômeros ao longo das fibras musculares⁽⁴⁻⁶⁾. Alguns trabalhos clássicos mostram que a imobilização dos músculos em posição alongada também acarreta o aumento no comprimento muscular, pela adição no número de sarcômeros em série, particularmente nas duas regiões terminais das fibras musculares⁽³⁻⁷⁾. Embora, nos estudos *in vitro* Deyne⁽⁶⁾ verificou que a aplicação de alongamento passivo uniaxial não inibiu, nem facilitou o aparecimento de linhas Z ou bandas A, assim como, sugeriu que é a contração ativa e não o alongamento passivo (estático), o responsável pela miofibrilogenesis (síntese de actina e miosina).

Alguns autores mostram também que a imobilização prolongada, seja em posição encurtada ou alongada, é comumente utilizada nas rotinas traumato-ortopédicas de membros inferiores, e parecem reduzir significativamente o número de sarcomeros em série, além de aumentar a deposição de tecido conectivo (colágeno) intramuscular e no perimísio. Este aumento do colágeno muscular poderia reduzir a força relativa e a dinâmica muscular para o movimento ativo, acarretando déficits funcionais no segmento corporal.

Estudos clássicos de Tabary et al.⁽⁵⁾ demonstraram que a imobilização em longo prazo do músculo solear na posição encurtada, produz uma diminuição de 40% no número de sarcômeros em série. Foi também observada por Williams & Goldspink et al.^(4,7,8) um remodelamento do perimísio no músculo sóleo de camundongos, duas semanas após imobilização em posição de encurtamento. Além disso, é bem descrito na literatura que os músculos imobilizados em posição encurtada apresentam abundância de tecido conjuntivo com significativo remodelamento nos períodos subseqüentes à imobilização. E que esta redução do comprimento da fibra muscular ocorre não somente quando é imobilizado em posição encurtada, mas também quando o músculo está trabalhando (remobilização) em amplitude articular diminuída⁽⁴⁻⁸⁾. Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi examinar as alterações morfofuncionais musculares (bíceps femoral) produzidas em resposta a três semanas exercícios de alongamento passivo (estático), após imobilização prolongada em posição encurtada de membro posterior (MP) de ratos sadios.

MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 32 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos provenientes do Biotério do CCS-UFES. Os animais foram pesados e aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais (n= 8 em cada): A – grupo (CONT) sem intervenção; B – grupo

imobilizado (IMOB) em posição encurtada por 21 dias; C – grupo remobilizado (LIVRE) por 21 dias; D – grupo alongado (ALONG) por 21 dias. Durante todo o estudo, os animais foram alojados em caixas individuais com fundo sólido, forradas com maravalha, em sala com luminosidade (12 h claro e 12 h escuro) e temperatura (20 a 25°C) controlada, e receberam dieta sólida (ração Nuvilab[®]) e água *ad libitum*. Não houve perda amostral e a investigação ocorreu de acordo com as normas estabelecidas pelo *Guide Care and Use of Laboratory Animals* e os critérios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA⁽⁹⁾, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – (CEUA/UFES parecer n°. 014/2008).

Modelo animal de imobilização prolongada de membro posterior por órtese estática

Os animais experimentais foram sedados com halotano a 3%, vaporizado em câmara de contenção. Sob anestesia, o encurtamento do músculo bíceps femoral esquerdo foi realizado pela técnica de imobilização na posição encurtada por órtese contentora estática⁽¹⁰⁻¹²⁾. Este tipo de imobilização está baseado na moldagem de uma órtese em material termoplástico flexível de 2,4 mm de espessura, OMEGA[®] MAX 3/32” (North Coast Medical, Morgan Hill, CA, USA). Os grupos IMOB e ALONG tiveram a órtese contentora moldada diretamente no membro inferior esquerdo (MIE) de cada animal. Sendo colocada de forma que a pata trazeira dos ratos permanecesse em flexão completa (joelho e tornozelo), isto é, posição de encurtamento do músculo bíceps femoral, a qual foi mantida por 21 dias consecutivos, conforme ilustrado na **figura 1**. O modelo de imobilização utilizado neste estudo foi baseado no proposto por Booth & Kelso⁽¹⁰⁾, readequado para um membro por Matheus et al.⁽¹¹⁾, com adaptação do material utilizado para construção da órtese.



Figura 1. Fotografia ilustrativa de modelo animal de imobilização de membro inferior (MI) esquerdo em posição encurtada por órtese contentora estática.

Alongamento passivo (estático) e procedimentos cirúrgicos

Logo após o período de imobilização do membro inferior esquerdo, a órtese estática foi retirada, e os animais do grupo ALONG foram tratados com um exercício de alongamento estático (passivo), no limite da amplitude articular impedida pela resistência dos tecidos moles (cápsulas, ligamentos e tendões do joelho e tornozelo). O exercício de alongamento estático foi aplicado no membro inferior E, uma vez ao dia, no período matutino, durante oito (8) minutos⁽²⁾ por três semanas consecutivas, resultando num total de 21 dias de alongamento passivo, conforme apresentado na **figura 2**. No grupo LIVRE, após o período de imobilização de 21 dias, foram retiradas as órteses, permitindo movimentos livres em suas gaiolas por mais 21 dias. Após este período, os animais foram sacrificados com uma dose letal de anestésico (Pentobarbital sódico) e então realizados os procedimentos cirúrgicos e coleta do músculo bíceps femoral e do osso fêmur. Em todos os animais, foi realizada uma incisão cirúrgica de 5.0 cm na região posterior da coxa da pata traseira direita, na qual o músculo bíceps femoral direito foi isolado e retirado de suas enteses proximal e distal para pesagem úmida, e na seqüência o processamento da rotina histológica. O fêmur esquerdo (homolateral) foi desarticulado e removido para medidas de comprimento (mm), realizadas a partir do ponto mais proximal da cabeça femoral até o sulco intercondilar da articulação do joelho E, utilizando-se um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, SP, Brasil).



Figura 2. Fotografia ilustrativa do exercício de alongamento passivo (estático) aplicado por 8 minutos em membro inferior esquerdo de ratos após 21 dias de imobilização encurtada por órtese estática.

Determinação do índice de trofismo muscular e da força muscular relativa

O índice de trofismo muscular foi calculado pela razão entre o peso úmido do músculo bíceps femoral (mg) e o peso corporal final (g) dos animais experimentais. Para determinar a força muscular relativa, ou seja, a força da massa muscular do bíceps femoral exercida sobre o



osso fêmur realizou-se uma correção do peso da massa muscular em relação ao comprimento do fêmur homolateral descrito pela equação: $m_f = P_m/f$, onde m_f representa a massa muscular, P_m representa o peso do músculo (mg) e f representa o comprimento do osso fêmur (mm).

Análises histomorfométricas

As amostras de tecido muscular (bíceps femoral E) foram obtidas e fixadas em paraformaldeído-10% (pH 7.0) por período mínimo de 24 horas. Após a fixação as amostras de músculo foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histológicos de rotina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados em pares de seções de 5 μ m de espessura utilizando micrótomo Spence modelo "820". As lâminas histológicas foram mantidas em estufa para secagem, e os cortes de tecido posteriormente submetidos à coloração por sítius red (SR), para posterior análise morfométrica das fibras musculares e do colágeno. Foi realizada captura de imagens de cinco campos (mm²) microscópicos de cada lâmina histológica com câmera digital (com objetiva de 40x) do microscópio de luz polarizada modelo AX70 Plus (Olympus[®], Tóquio, Japão). As análises histomorfométricas foram realizadas e avaliadas através das imagens de cada grupo capturadas por sistema computadorizado de imagens Sigma-pro[®] (Sigma, St Louis, MO, USA), e armazenadas. No final do estudo, as imagens dos cortes histológicos arquivadas foram submetidas à contagem da fração volumétrica de fibras musculares e de colágeno (mm²) com auxílio de marcação digital por contraste de cor^(13,14).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos neste estudo foram inseridos em planilhas específicas e analisadas por software estatístico Prism-5[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Tukey como *post hoc*, e o teste não-paramétrico de Mann-Witney U, quando apropriado. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância para diferenças estatísticas foi estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na **Tabela 1** estão apresentados os efeitos morfofuncionais da imobilização prolongada em posição de encurtamento e do exercício de alongamento passivo (estático). Em relação ao peso corporal não foram observadas alterações significantes entre os valores nos diferentes grupos experimentais. Conforme esperado, no grupo IMOB foi verificada uma redução significativa nos valores de massa muscular e no comprimento do osso fêmur, assim como, uma atrofia muscular (diminuição do trofismo) com redução da força muscular relativa quando comparado com os grupos CONT, LIVRE e ALONG. O alongamento passivo no grupo ALONG promoveu um significativo aumento da massa do músculo bíceps femoral quando comparado com os grupos IMOB e CONT.

Tabela 1. Efeitos morfofuncionais da imobilização prolongada e do alongamento passivo (estático) nos grupos experimentais

Parâmetros	CONT (n = 8)	IMOB (n = 8)	LIVRE (n = 8)	ALONG (n = 8)
Peso Corporal (g)	347 \pm 18	336 \pm 10	355 \pm 15	340 \pm 13

Massa do bíceps femoral (mg)	332 ± 15	125 ± 23 ^{*#†}	349 ± 18	379 ± 10 [*]
Comprimento do fêmur (mm)	39 ± 0.5	33 ± 0.7 ^{*#†}	38 ± 0.4	38 ± 0.5
Trofismo muscular (mg/g)	0.956 ± 0.08	0.372 ± 0.23 ^{*#†}	0.983 ± 0.12	1.114 ± 0.17
Força muscular relativa (mg/mm)	8.73 ± 0.66	3.67 ± 0.68 ^{*#†}	9.09 ± 0.47	9.99 ± 0.51

Valores expressos como média ± erro padrão da média (EPM). CONT, controle; IMOB, imobilizados com órtese estática por 21 dias; LIVRE, remobilizados livre por 21 dias; ALONG, alongados por 21 dias. ANOVA uma via, teste de Tukey como post hoc.

* p < 0,05 versus CONT;

p < 0,05 versus LIVRE;

† p < 0,05 versus ALONG.

Na avaliação histomorfométrica do músculo bíceps femoral verificou-se que a imobilização prolongada na posição encurtada (IMOB) promoveu uma hiperplasia muscular (aumento de miofibrilas), além de um aumento do colágeno no perimísio muscular em relação aos grupos CONT, LIVRE e ALONG, conforme apresentado na **Figura 3** e na **Tabela 1**. Já o tratamento de três semanas com alongamento passivo promoveu uma melhora do índice de trofismo muscular com significativa redução da deposição de colágeno no perimísio muscular quando comparado aos grupos CONT, IMOB e LIVRE. No entanto, apesar do grupo LIVRE ter reduzido a deposição de colágeno em relação ao grupo IMOB, apresentou um aumento em relação ao grupo ALONG.

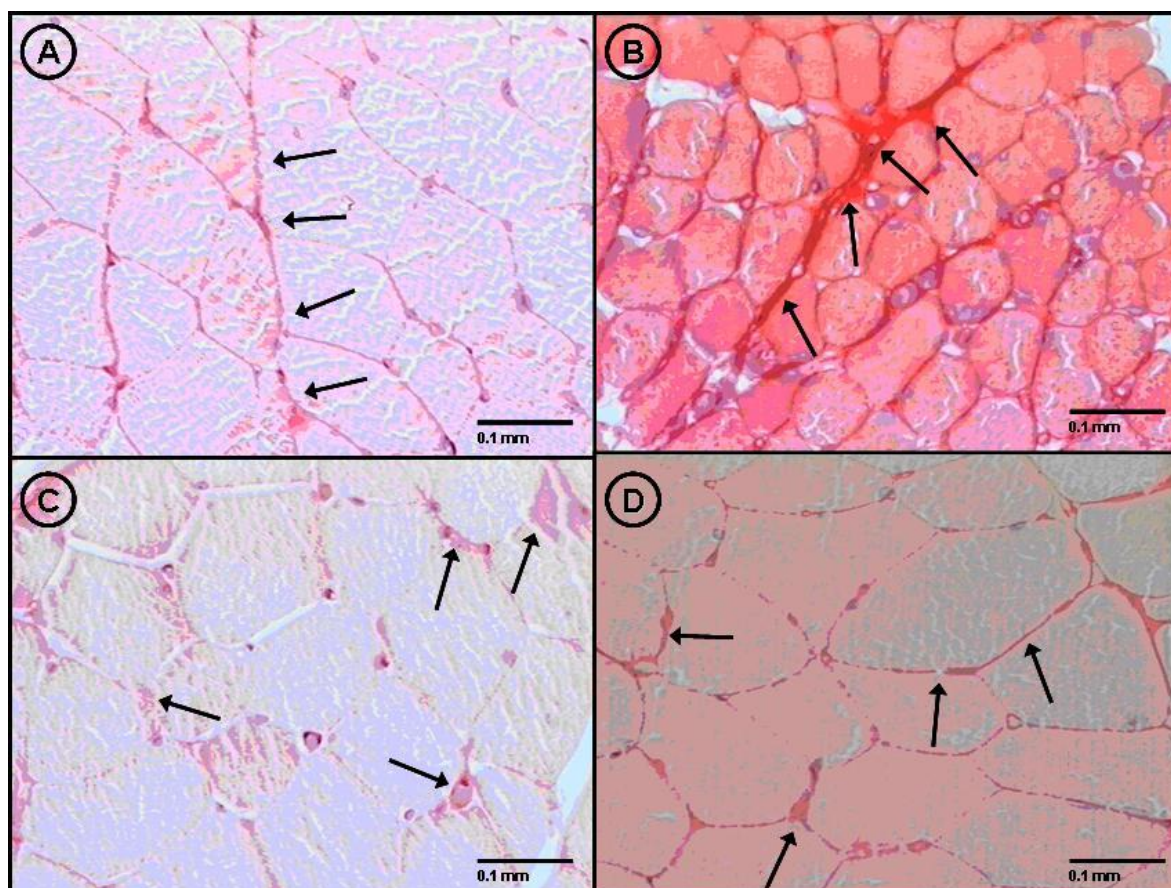


Figura 3. Montagem de fotomicrografias dos cortes histológicos do músculo bíceps femoral esquerdo nos grupos experimentais: (A) Controle; (B) Imobilizado em membro inferior esquerdo com órtese estática por 21 dias; (C) Remobilizados livre; (D) Alongados. As setas (↑) destacam o grau de deposição de colágeno no perimísio muscular, o nível de trofismo muscular e a hiperplasia miofibrilar (Sirius red, objetiva de 40x, escala de 0.1 mm).

A hiperplasia miofibrilar, ou seja, a quantidade de miofibrilas no músculo bíceps femoral, os animais do grupo ALONG apresentaram uma significativa redução quando comparado com o grupo IMOB, assim como, uma melhora do grau de trofismo miofibrilar. No entanto, no grupo LIVRE não houve diferenças em relação ao CONT e ALONG. Na relação colágeno/músculo intramuscular foi constatado que a imobilização prolongada (IMOB) em posição encurtada por órtese estática promoveu aumento da razão colágeno/músculo quando comparados com os grupos CONT, LIVRE e ALONG. Mostrou também que três semanas de tratamento com alongamento passivo diminuiu a relação colágeno/músculo quando comparado com os grupos CONT e LIVRE, conforme apresentado na **Tabela 2 e Figura 3**.

Tabela 2. Avaliação histomorfométrica de cortes histológicos do músculo bíceps femoral direito de todos os grupos experimentais

Parâmetros	CONT (n = 8)	IMOB (n = 8)	LIVRE (n = 8)	ALONG (n = 8)
Colágeno (mm ²)	82 ± 3	119 ± 4 ^{*#†}	88 ± 3 [†]	72 ± 2 ^{*#}
Fibras musculares (mm ²)	545 ± 17	552 ± 8	543 ± 11	593 ± 7 [*]
Relação colágeno/músculo	0.157 ± 0.019	0.216 ± 0.016 ^{*#†}	0.164 ± 0.012	0.122 ± 0.006 ^{*#}

Valores expressos como média ± erro padrão da média (EPM). CONT, controle; IMOB, imobilizados com órtese estática por 21 dias; LIVRE, remobilizados livres por 21 dias; ALONG, alongados por 21 dias. Teste de Mann-Witney U.

* p < 0,05 versus CONT;

p < 0,05 versus LIVRE;

† p < 0,05 versus ALONG.

DISCUSSÃO

Neste estudo foram demonstradas as alterações das propriedades musculares plásticas produzidas pela imobilização prolongada (posição encurtada), remobilização livre e pelo alongamento passivo, que foram avaliadas através de parâmetros histomorfométricos e biomecânicos do músculo bíceps femoral em membro posterior de ratos saudáveis. Os dados deste estudo mostraram que a imobilização prolongada do músculo bíceps femoral na posição encurtada modificou todos os parâmetros morfofuncionais musculares avaliados, ou seja, ocasionou uma significativa hipotrofia muscular com hiperplasia miofibrilar compensatória, encurtamento muscular e ósseo, além de aumento da deposição de colágeno no perimísio, o que pode ter facilitado a elevação do grau de atrofia miofibrilar aguda e redução da força relativa observadas no músculo bíceps femoral dos ratos, dados estes que corroboram com outros achados na literatura em modelos animais de imobilização encurtada^(12,15,16). Este estudo também demonstra que três semanas consecutivas de exercício de alongamento passivo com duração de oito minutos, foram suficientes para restabelecer o grau de trofismo muscular e reduzir significativamente a hiperplasia miofibrilar, além de diminuir a deposição de colágeno no perimísio do bíceps femoral



de ratos saudáveis após imobilização. Ainda mostrou que a remobilização livre foi capaz de retornar os níveis de hiperplasia e a atrofia miofibrilar observadas, contudo não melhorou a relação entre a deposição de tecido conectivo e a massa contrátil do músculo bíceps.

Estudos clássicos, assim como, investigações recentes demonstram que tanto a imobilização prolongada, como o desuso são caracterizados principalmente pela disfunção muscular contrátil associada com atrofia muscular aguda, que vem sendo considerado um processo passivo sofrido pelo tecido muscular^(4,5,7,8,16,17). Mostram também que a imobilização gera uma atrofia aguda das fibras musculares tipo I e tipo II, as quais estão associadas com um aumento na proteólise, e não no decréscimo da síntese proteica muscular^(12,15-18). Neste estudo, verificou-se que a imobilização prolongada promoveu uma significativa hiperplasia miofibrilar compensatória, ocorrida provavelmente em resposta a atrofia miofibrilar (hipotrofia) produzida pelo desuso, e observadas no bíceps femoral dos animais do grupo imobilizados. Por outro lado, observou-se que o alongamento passivo aplicado por oito segundos nos membros posterior esquerdo de ratos durante 21 dias, reduz significativamente a deposição de colágeno e a hiperplasia muscular após imobilização encurtada de bíceps femoral. Chang et al.⁽¹⁹⁾ e outros autores^(16,17,20) descrevem que níveis teciduais de óxido nítrico (NO) estão envolvidos na sinalização para regulação do número de sarcomeros musculares e com a miofibrilogênese (síntese de actina e miosina). Alguns autores sugerem também que o desuso induzido pela imobilização prolongada em posição encurtada aumenta o número de micro-lesões nas miofibrilas acarretando elevação da produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres no tecido muscular. O que poderia favorecer a redução da biodisponibilidade do NO com consequente diminuição na miofibrilogênese.

Adicionalmente, ao contrário do tecido muscular, quando o tecido conectivo é submetido à imobilização, provavelmente não ocorre diminuição no número de fibras colágenas^(21,22). Alguns experimentos demonstraram aumento da degradação e síntese do colágeno sem alteração na sua concentração⁽²³⁾. Ao mesmo tempo, está descrito que ocorre uma redução na quantidade de água e glicosaminoglicanas, tornando o tecido menos elástico e mais quebradiço^(23,24). Outros estudos mostram que a diminuição do espaço entre as fibras colágenas, aliada à produção e deposição aleatória de colágeno imaturo, favorece a formação de ligações intermoleculares em locais indesejáveis e limita a amplitude de movimento articular⁽²²⁾. Como consequência à limitação articular, maior quantidade de força será requerida para mover o segmento imobilizado através da amplitude de movimento normal⁽²²⁻²⁴⁾. Woo et al.⁽²³⁾ demonstraram que após imobilizar o joelho de coelhos em flexão durante nove semanas, o torque necessário para estender a articulação aumentou dez vezes quando comparado com o grupo controle não imobilizado. Seus resultados também mostraram que esse torque diminuía à medida que o joelho era sucessivamente estendido, sugerindo que nas primeiras tentativas de imobilização, o movimento forçado era capaz de romper ligações estabelecidas entre as moléculas de colágeno. A quebra de ligações intermoleculares aumenta a mobilidade da articulação e facilita os movimentos subsequentes, o que justificaria uma menor deposição de colágeno no grupo ALONG e LIVRE quando comparado com o grupo IMOB.

Todavia, a aplicação do alongamento passivo pode ter efeitos a curto e em longo prazo, promovendo alterações tanto no tecido muscular quanto nos tecidos conectivos⁽²⁵⁾. Os efeitos a curto-prazo ou agudos (segundos ou minutos) podem incluir eventos como alteração no comprimento do tendão; nos elementos dos componentes elásticos em série ou em paralelo ou na distribuição do comprimento dos sarcômeros dentro das fibras musculares. Portanto, os efeitos imediatos do alongamento (primeiros 60 segundos) contemplam as alterações viscoelásticas passivas, o que leva à redução da resistência ao alongamento. Os efeitos em longo prazo do



alongamento (várias semanas) são principalmente, a hipertrofia induzida, a qual parece aumentar a força tecidual⁽²⁶⁻²⁸⁾. Sendo assim, é evidente na literatura que de alguma forma, o alongamento passivo altera as propriedades mecânicas do músculo e aumenta o comprimento muscular⁽²⁹⁻³³⁾. Segundo Goldspink et al.^(4,5,7,8,31), as modificações na estrutura e propriedades musculares são possíveis devido à alta capacidade de remodelação do tecido muscular, ou seja, a reconhecida plasticidade muscular. Esses e outros estudos^(12,15-17) corroboram nossos achados que apresentam aumento na massa muscular (hipertrofia), redução da hiperplasia miofibrilar e diminuição da deposição de colágeno no perímio do bíceps femoral, além de demonstrar uma redução na relação colágeno/músculo de ratos saudáveis após alongamento passivo crônico.

Apesar de resultados semelhantes encontrados na literatura quanto às análises abordadas no desuso muscular, alguns pontos se diferenciam devido à diversidade de fatores que o influenciam, destacando-se a tipagem de fibra, a posição articular, o tempo de aplicação da técnica e a técnica de alongamento escolhida (alongamento passivo). Nesse sentido, há uma necessidade de maiores estudos, com análises e técnicas de biologia celular e molecular que contemplem as diferentes variáveis que interferem nesse processo.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos professores CA. Redins e JC. Novaes por disponibilizar os laboratórios de histologia e imunohistoquímica e pelo auxílio na confecção e análises dos cortes histológicos do presente estudo. Esta pesquisa foi parcialmente financiada pela bolsa de recém-doutor nº. 028/2008 (CDV-FACITEC). Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Safran MR, Seaber AV, Garret WE. Warm-up and muscular injury prevention: an update. *Clin J Sport Med.* 1989; 8:239-49
2. Endlich PW, Farina GR, Dambroz C, Gonçalves WLS, Moyses MR, Mill JG, Abreu GR. Efeitos agudos do alongamento estático no desempenho da força dinâmica em homens jovens. *Rev Bras Med Esp.* 2009; 15(3):200-3
3. Kisner C, Colby LA. In: *Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas.* 3ª edição, ed. Manole Ltda: São Paulo, 1998, p.141-57.
4. Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilised muscle. *J Anat.* 1984; 138(2):343-50.
5. 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.
6. Deyne PG. Formation of sarcomeres in developing myotubes: role of mechanical stretch and contractile activation. *J Physiol Cell.* 2000; 279:1801-11.
7. Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat.* 1988; 158:109-14.
8. Yang H, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. *J Anat.* 1997; 190(4):613-22.
9. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik D. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.* São Paulo: UNIFESP, 2004.



10. Booth FW, Kelso JR. Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *J Appl Physiol.* 1973; 34(3):404-6.
11. Matheus JPC, Shimano AC. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Rev Bras Med Esp.* 2007; 13(1):55-9.
12. Coutinho EL, Gomes ARS, 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.
13. Gonçalves WLS, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JGP, et al. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(6):877-84.
14. Santuzzi CH, Buss HF, Pedrosa DF, Freire MOV, Nogueira BV, Gonçalves WLS. Uso combinado da laserterapia de baixa potência e da inibição da ciclooxigenase-2 na reepitelização de ferida incisional em pele de camundongos: Um estudo pré-clínico. *An Bras Dermatol.* 2010; 85:000-000 [in press].
15. Gomes ARS, Coutinho EL, Franca CN, Polônio 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(10):1473-80.
16. Coutinho EL, Gomes ARS, 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.
17. Gomes ARS, Cornachione A, Salvini TF, Mattiello-Sverzut AC. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. *J Anat.* 2007; 210(3):328-35.
18. Durigan JLQ, Cancelliere KM, Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ. Modelos de desuso muscular e estimulação elétrica neuromuscular: aspectos pertinentes à reabilitação fisioterapêutica. *Fisioter Moviment.* 2005; 18(4):53-62.
19. Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BS, McCabe TJ, McMillan K, Padre RC, Spencer MJ, Tidball JG, Stull JT. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Nat Acad Sci.* 1996; 93: 9142-47.
20. Koh TJ & Tidball W. Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1999; 519:189-96.
21. Aquino CF, Viana SO, Fonseca ST. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e à imobilização. *Fisioter Moviment.* 2005; 18(2):35-43.
22. Akeson WH, Amiel D, Abel MF et al. Effects of immobilization on joints. *Clin Orthop.* 1987; 219:28-37.
23. Woo SL-Y, Matthews JV, Akeson WH, Amiel D, Convery FR. Connective tissue response to immobility: Correlative study of biomechanical measurements of normal and immobilized rabbit knees. *Arthritis Rheum.* 1975; 18 (3):257-64.
24. Engles M, Donatelli RA, Wooden MJ. Tissue response. In: *Orthopaedic Physical Therapy.* 3ª edição, ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2001, p.1-24.
25. Black JDJ, Freeman M, Stevens ED. A 2 week routine stretching programme did not prevent contraction-induced injury in mouse muscle. *J Physiol.* 2006; 544:137-47.
26. Kubo K, Kanehisa H, Fukunaga T. Effects of resistance and stretching training programmes on the viscoelastic properties of human tendon structures in vivo. *J Physiol.* 2002; 538(1):219-26.



27. Magnusson SP, Simonensen EB, Aagaard P, Kjaer M. Biomechanical responses to repeated stretches in human hamstring muscle in vivo. *Am J Sports Med.* 1996; 24(5):622-28.
28. 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.* 2004; 36(5):756-9.
29. Taylor DC, Dalton JD, Seaber AV, Garrett WE. Viscoelastic properties of muscle-tendon units. *Am J Sports Med.* 1990; 18(3):300-9.
30. Weir DE, Tingley J, Elder GCB. Acute passive stretching alters the mechanical properties of human plantar flexors and the optimal angle for maximal voluntary contraction. *Eur J Appl Physiol.* 2005; 93:614-23.
31. Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat.* 1995; 194:323-34.
32. Fowles JR, Sale DG, Macdougall JD. Reduced strength after passive stretch of the human plantar flexors. *J Appl Physiol.* 2000; 89:1179–88.
33. Avela J, Finni T, Liikavainio T, Niemelä E, Komi PV. Neural and mechanical responses of the triceps surae muscle group after 1h of repeated fast passive stretches. *J Appl Physiol.* 2004; 96:2325-32.